

**Die Funktion des Ubichinons und der
b-Typ Cytochrome in den Atmungsketten von
Neurospora crassa Wildtyp und
Neurospora crassa Wildtyp, gezüchtet
mit Chloramphenicol**

Christel Bohrer

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die Funktion des Ubichinons und der b-Typ Cytochrome
in den Atmungsketten von Neurospora crassa Wildtyp und
Neurospora crassa Wildtyp, gezüchtet mit Chloramphenicol

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Christel Bohrer
aus
Madrid

München
1975



1. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler
2. Berichterstatter: Prof.Dr.K.-H.Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1975

Die Experimente zur vorliegenden Dissertation wurden von 1973 bis 1975 am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. G. von Jagow durchgeführt, dem an dieser Stelle für alle Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit besonders gedankt sei.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich ausdrücklich für die Übernahme des ersten Referates für meine Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. A. Kröger und Herrn Prof. Dr. M. Klingenberg bin ich dankbar für wertvolle Hinweise und Diskussionsbeiträge.

Mein Dank gilt auch Frau E. Wieninger und Frau I. Prinz für ihre technische Hilfe und kollegiale Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51) angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1. Cyanidunempfindliche Atmung bei höheren Pflanzen	1
1.2. Cyanidunempfindliche Atmung bei <i>Neurospora crassa</i>	3
1.2.1. Die <i>Neurospora</i> -Mutanten <i>mi-1</i> und <i>mi-3</i>	4
1.2.2. <i>Neurospora</i> Wildtyp, gezüchtet mit Chloramphenicol	5

2. Material und Methoden

2.1. Zucht der Hyphen	11
2.2. Präparation der Mitochondrien	15
2.3. Präparation der submitochondrialen Partikel	15
2.4. Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation	17
2.5. Präparation von Durohydrochinon	18
2.6. Bestimmungsmethoden	
2.6.1. Amperometrische Bestimmung der Atmungsaktivität	19
2.6.2. Spektrophotometrische Bestimmung der Cytochromgehalte	20
2.6.3. Bestimmung des Redoxzustands von Ubichinon	22
2.6.4. Spektrophotometrische Methodik bei Antimycintitrationen	26
2.6.5. Proteinbestimmung	27

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Die Veränderung der Cytochromgehalte bei Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese	29
3.1.1. Die Cytochromspektren des Wildtyps	29
3.1.2. Die Cytochromspektren des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps	35
3.1.3. Die Aufrechterhaltung der Äquimolarität der beiden b-Typ Cytochrome	38
3.2. Das Auftreten einer cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps	43
3.2.1. Hemmstoffempfindlichkeit der Atmung intakter Hyphen und isolierter Mitochondrien	46
3.2.2. Atmungsraten und ihre Hemmstoffempfindlichkeit in Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen	48
3.3. Die Verzweigung des Elektronenflusses in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps	49
3.3.1. Hemmstofftitrationen der Atmungsaktivität und des Reduktionsgrades von Ubichinon	51
3.3.2. Die Atmungsaktivitäten in Abhängigkeit von dem Ubichinongehalt bei Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation	55

3.3.3. Der Redoxzustand der b- und c-Typ Cytochrome bei Hemmung der Atmungskette durch Antimycin	57
3.3.4. Unterschiedliche Hemmung der NADH- und der Durohydrochinon-Oxidation durch Antimycin	60
3.3.5. Der Redoxzustand von Ubichinon bei Hemmung der Atmungskette durch KCN oder Antimycin	64
3.4. Die Antimycin-Wirkung auf die Elektronen-übertragende Aktivität der b-Typ Cytochrome	69
3.4.1. Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation durch Antimycin	70
3.4.2. Hemmung der Durochinon-Reduktion durch Antimycin	72
3.4.3. Zunahme des Cytochrom b_{563} -Reduktionsgrades bei Antimycintitrationsen	76
4. <u>Diskussion</u>	
4.1. Fragen zum Auftreten und zur Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase in der verzweigten Atmungskette	78
4.2. Ubichinon als Redoxüberträger zwischen den Dehydrogenasen, den b-Typ Cytochromen und der cyanidunempfindlichen Oxidase	86
4.3. Neue Aspekte zum Mechanismus der Antimycinhemmung und zur Funktion der b-Typ Cytochrome	89
Literaturverzeichnis	95

Verzeichnis der Abkürzungen

NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
TMPD	N,N,N,N Tetramethylphenylendiamin
FCCP	Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenyl- hydrazon
CAP	Chloramphenicol
SAM	Salicylhydroxamsäure
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubihydrochinon
DQ	Durochinon (Tetramethyl-p-benzochinon)
DQH ₂	Durohydrochinon (Tetramethyl-p-benzohydro- chinon)
RNS	Ribonukleinsäure

1. Einleitung

1.1. Cyanidunempfindliche Atmung bei höheren Pflanzen

Die eingehenden Untersuchungen von van Herk (1,2,3), Yocum und Hackett (4), Chance und Hackett (5), Bendall et al. (6,7,8) und Storey und Bahr (9,10) an *Sauromatum guttatum*, *Arum maculatum*, *Symplocarpus foetidus* (Ara-ceae) und *Phaseolus aureus* (Leguminosae) haben gezeigt, daß die Atmung bestimmter Pflanzen unempfindlich gegenüber den üblichen Hemmstoffen der Cytochromoxidase, wie etwa Cyanid (11), Kohlenmonoxid (12) oder Azid (8) ist.

Die Messungen wurden anfangs am intakten Gewebe durchgeführt. Später konnte, nach der Ausarbeitung geeigneter Methoden zur Isolierung der Mitochondrien (13) gezeigt werden, daß die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität tatsächlich eine besondere Eigenschaft des mitochondrialen Elektronentransportsystems ist (14,12,15).

Die darauffolgenden, umfangreichen Studien der verschiedenen Arbeitsgruppen führten zur Aufstellung einer Reihe von Hypothesen zur Identifizierung der Atmungskettenkomponente und zur Erklärung des Mechanismus, welche die cyanidunempfindliche Atmung ermöglichen.

Van Herk (3) stellte die Theorie einer autoxidablen Flavoproteinkomponente auf, Bendall und Hill (6) fanden in ihrer Mitochondrienpräparation ein b-Typ Cytochrom ("b₇") mit ähnlichen Eigenschaften. Chance und Hackett (5) diskutierten die Möglichkeit einer nur unvollständig cyanidhemmbaren Cytochrom c-Oxidase, Bonner (16) erwog die Existenz eines weiteren Cytochroms vom a-Typ als zweite Endoxidase.

Später wurden die vier oben genannten Hypothesen verworfen (8,17,18) zugunsten des von Okuniki (19) sehr früh entwickelten Konzepts einer verzweigten Atmungskette.

In der verzweigten Atmungskette werden die Elektronen von einem Substrat, wie z.B. NADH, anfangs einheitlich über einen gemeinsamen Weg, dann über zwei getrennte Wege zum Sauerstoff geleitet: ein nur geringer Anteil des Elektronenflusses verläuft über den bekannten cyanid- und antimycinhemmbaren Weg, der die Cytochrome beinhaltet; der größere Anteil des Elektronenflusses führt über eine Verzweigung, welche substratseitig von der Antimycinhemmstelle lokalisiert ist, und einen zweiten Weg, der eine cyanidunempfindliche Endoxidase beinhaltet, zum Sauerstoff.

Die cyanidunempfindliche Oxidase konnte bis jetzt noch nicht näher beschrieben werden. Es existieren von diesem Enzym keine charakteristischen Lichtabsorptionssignale, wie sie etwa für Flavine und Cytochrome bekannt sind.

Schonbaum et al. (20) konnten aber zeigen, daß die cyanidunempfindliche Oxidase spezifisch durch Hydroxamsäurederivate, wie u.a. Salicylhydroxamsäure, gehemmt wird. Es wird angenommen, daß diese Hemmung auf der Bildung eines Chelatkomplexes mit einem Übergangsmetall beruht. Diese Annahme wird erhärtet durch den Befund, daß durch die Zugabe von steigenden Mengen an Fe(III)-Ionen die Hemmung in wachsendem Maße aufgehoben werden kann (21). Zusätzlich wurde bei Messungen der Elektronenspinresonanz an *Symplocarpus foetidus* festgestellt, daß nach Zugabe eines Hydroxamsäurederivats eine Erhöhung des ESR-Signals im Bereich $g \approx 2$ registriert wird (20). Demzufolge könnte die cyanidunempfindliche Oxidase ein Eisen-Schwefel-Protein darstellen.

Obwohl die Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase noch ungeklärt ist, kann die verzweigte Atmungskette, mit einem cyanidempfindlichen und einem cyanidunempfindlichen Weg, bereits als ein wichtiges Instrument bei der Aufklärung der Funktion anderer, am Elektronentransport beteiligter Komponenten der Atmungskette dienen.

1.2. Cyanidunempfindliche Atmung bei *Neurospora crassa*

Für die Untersuchung spezieller biochemischer und mikrobiologischer Fragestellungen werden in immer größerem Maße Mikroorganismen herangezogen, da sie gegenüber Zellen, die in einem Gewebeverband organisiert sind, zahlreiche Vorteile aufweisen. *Neurospora crassa*, der rote Brotschimmelpilz, ist ein wichtiger Vertreter dieser in der Forschung verwendeten Mikroorganismen.

Die Hyphen des obligat aerob wachsenden Ascomyceten können in ausreichenden Mengen unter relativ geringem Aufwand von Raum und Kosten gezüchtet werden. Auch die Präparationsmethode zur Isolierung der Mitochondrien ist gut ausgearbeitet (22). Ein weiterer Vorteil liegt in der bereits wohldefinierten Genetik des Pilzes. Es sind einige gut untersuchte Mutanten bekannt (23,24,25,26,27) und zudem ist es möglich, durch besondere Kulturbedingungen, wie etwa durch die Zugabe eines bestimmten Stoffes zum Wachstumsmedium, eine gezielte Veränderung der Umwelt einzustellen. Als Folge hiervon tritt eine Veränderung des Organismus auf (28,29,30).

Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, a) daß es natürlich vorkommende Mutanten von *Neurospora crassa* gibt; deren Atmung im Gegensatz zu der Atmung des Wildtyps größtenteils cyanidunempfindlich ist

(25,26,31,32,33) und, b) daß es möglich ist, durch Zugabe des Antibiotikums Chloramphenicol zum Kulturmedium des Wildtyps Veränderungen hervorzurufen, die u.a. zum Auftreten einer cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität führen (25,34,35,36).

1.2.1. Die Neurospora-Mutanten mi-1 und mi-3

Die umfangreichen Arbeiten von Mitchell et al. (37,38, 39,40,41) führten zur Charakterisierung der mütterlich vererbten (mi $\hat{=}$ "maternally inherited") Neurospora-Mutanten mi-1 (auch "poky" Mutante genannt) und mi-3. Sie zeichnen sich u.a. durch ihr langsames Wachstum aus und dadurch, daß bei Kreuzungsversuchen die Mendel'schen Gesetze nicht erfüllt werden.

In der Zwischenzeit wurde im Detail aufgeklärt, daß in der eukaryotischen Zelle zwei getrennte Proteinsynthesysteme wirksam sind. Neben dem cytoplasmatischen System, welches die Information der Zellkern-DNS zur Proteinsynthese verwendet, ist ein vollständiger, von einer extrachromosomalen DNS determinierter, Transkriptions- und Translationschritte durchführender Proteinsyntheserapparat in den Mitochondrien enthalten (42,43,44,45,46).

Die Mutation bei den mi-Mutanten von Neurospora beruht auf einem genetischen Defekt des mitochondrialen Proteinsynthesystems (24,47). Dieser Defekt führt zu einer drastischen Veränderung der Atmungskette (39,31). Die Hauptmerkmale liegen in einer Verschiebung der molaren Stöchiometrie der einzelnen Atmungskettenkomponenten und im Auftreten einer zusätzlichen, cyanidunempfindlichen Endoxidase, welche spezifisch durch Sali-
cylhydroxamsäure gehemmt werden kann (32,34).

1.2.2. Neurospora Wildtyp, gezüchtet mit Chloramphenicol

Die beiden oben erwähnten, getrennten Systeme der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Proteinsynthese, welche allgemein in eukaryotischen Zellen vorhanden sind, lassen sich dadurch unterscheiden, daß sie gezielt durch verschiedene Hemmstoffe blockiert werden (48,49,50).

Bemerkenswerterweise ist das mitochondriale Proteinsynthesystem unter zahlreichen Gesichtspunkten mit dem Proteinsynthesystem von Chloroplasten in grünen Pflanzen und mit dem Proteinsynthesystem der Prokaryonten zu vergleichen. Ein gemeinsames Merkmal ist u.a. das Vorkommen von Ribosomen mit einer Sedimentationskonstante von 70 S anstatt von 80 S, wie sie für die Ribosomen des cytoplasmatischen Proteinsynthesystems bestimmt wird (51,52).

Einer der wirksamen Hemmstoffe ist das Breitspektrum-Antibiotikum Chloramphenicol.

Chloramphenicol, von Ehrlich et al. (53) in Kulturen von *Streptomyces venezuelae* gefunden, ist das erste Antibiotikum, welches auf organisch-chemischem Wege synthetisiert werden konnte, und bis heute das einzige, das für medizinische Zwecke in großindustriellem Maßstabe so hergestellt wird. Von den vier möglichen Stereoisomeren ist nur die in der Natur vorkommende D(-)threo Form von biologischer Bedeutung (54,55).

Durch Markierungsexperimente konnten Vazquez et al. (56, 57) erstmals zeigen, daß Chloramphenicol an die 50 S Untereinheit von Bakterienribosomen gebunden wird. Durch Inaktivierung der Polypeptidyl-Transferase wird die Synthese der Peptidketten blockiert, d.h. Chloramphenicol hemmt spezifisch einen Translationsschritt.

Anschließend wurden Smillie et al. (58) in ihrer Vermutung bestätigt, daß generell die Bindung von Chloramphenicol spezifisch an die 50 S Untereinheit von 70 S Ribosomen, jedoch an keine der Untereinheiten von 80 S Ribosomen erfolgt (59,60). Dementsprechend hat die Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol bei verschiedenen Organismen sehr unterschiedliche Auswirkungen.

Bei Bakterien kommt es in den Fällen, in denen die volle Hemmwirkung des Antibiotikums erzielt werden kann, wie etwa bei *Shigella flexneri*, zur Abtötung der Organismen (61). Häufig allerdings wird die Proteinsynthese nicht vollständig blockiert und Chloramphenicol zeigt, wie z.B. bei *Staphylococcus aureus* (54) oder *Escherichia coli* (62), einen bakteriostatischen Effekt, d.h. es bewirkt eine Abnahme der Wachstumsrate der Bakterien.

Bei den Grünalgen *Euglena gracilis* (58,63) und *Scenedesmus quadricauda* (64) konnte nach Zugabe von Chloramphenicol eine spezifische Hemmung der Chloroplastensynthese beobachtet werden.

Bei heterotroph wachsenden eukaryotischen Zellen führt der Zusatz von Chloramphenicol wie erwartet zu der spezifischen Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese (50,51,52). Infolge dieser spezifischen Hemmung wird der Aufbau gerade der Proteine, deren Synthese teilweise in den Mitochondrien erfolgt, beeinträchtigt.

Untersuchungen von Schatz et al. (65,66) und Tzagoloff et al. (67,68) an Hefemitochondrien, sowie von Sebald et al. (69) und Weiss et al. (70,71) an *Neurospora*-Mitochondrien brachten die Erkenntnis, daß die mitochondriale Proteinsynthese u.a. für die Synthese der Oligomycinsensitiven ATPase und für den Aufbau der Cytochrome a, a_3 und b von Bedeutung ist.

Mit Hilfe von Markierungsexperimenten und unter Verwendung von Cycloheximid (als Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese, vergl. 72,29) oder Chloramphenicol konnte gezeigt werden, daß die ATPase sowie die Cytochrome a, a_3 und b aus Untereinheiten aufgebaut sind. Diese Untereinheiten werden zum Teil an den Ribosomen des Cytoplasmas, zum Teil an den Ribosomen der Mitochondrien synthetisiert.

Auf die Proteinsynthese der ATPase soll im weiteren nicht näher eingegangen werden (vergl. Lit. 66 und 67).

Für Cytochrom a, a_3 wurden bei *Saccharomyces carlsbergensis* und *Neurospora crassa* übereinstimmend sieben Polypeptiduntereinheiten mit verschiedenen Molekulargewichten gefunden (65,68,69). Von diesen Polypeptiden werden die drei mit den größten Molekulargewichten in den Mitochondrien aufgebaut.

Aus *Neurospora* konnte ein noch nicht näher definiertes b -Typ Cytochrom mit einem Molekulargewicht von etwa 60.000 isoliert werden (70,71). Das Protein läßt sich chromatographisch in zwei Polypeptide mit jeweils einem Molekulargewicht von etwa 30.000 auftrennen. Zumindest eine dieser beiden Untereinheiten ist ein mitochondriales Translationsprodukt.

Durch Chloramphenicol als Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese kann die Synthese der in den Mitochondrien aufgebauten Untereinheiten von Cytochrom a, a_3 und Cytochrom b teilweise oder vollständig gehemmt werden, was zur Folge hat, daß entweder die Gehalte an diesen beiden Atmungskettenkomponenten in den Mitochondrien herabgesetzt sind oder daß die betreffenden Cytochrome gar vollständig fehlen.

Eine Kultur von *Neurospora* Wildtyp Hyphen, welche mit einer definierten Konzentration an Chloramphenicol gezogen wurde, soll fortan in diesem Text als "Chloramphenicol-gezüchteter Wildtyp" bezeichnet werden.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit die Atmungskette von *Neurospora* verändert werden kann, wenn die Hyphen mit verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen gezüchtet werden.

Insbesondere wurde eine eingehendere Analyse der Gehalte und der molaren Stöchiometrie der beiden b-Typ Cytochrome vorgenommen. Es wurde differenziert zwischen dem Anteil der Cytochrome, der durch Dithionit reduzierbar (chemisch reduzierbar) ist und dem, der durch Succinat reduzierbar (enzymatisch reduzierbar) ist.

Außerdem sollte genauer untersucht werden, wie synchron mit der Hemmung der Proteinsynthese, welche die Cytochrome betrifft, die Zugabe von Chloramphenicol zum Auftreten einer zusätzlichen Oxidase in der Atmungskette dieser Organismen führt. Berichte über dieses Phänomen liegen bereits vor (25,32,34). Tatsächlich wird durch hohe Konzentrationen von Chloramphenicol (3-4 g/l) bei *Neurospora* Wildtyp eine Atmungskette hervorgerufen, wie sie in der *mi-1* Mutante gefunden wird. Sowohl in der *mi-1* Mutante als auch im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp ermöglicht die zusätzliche Oxidase den Transport von Redoxäquivalenten zum Sauerstoff über einen zweiten Atmungsweg. Es handelt sich, wie bei der Atmungskette von Mitochondrien aus höheren Pflanzen, welche eine cyanidunempfindliche Atmung aufweisen, um eine verzweigte Atmungskette. Ebenfalls in Analogie zu der pflanzlichen Atmungskette wird in der verzweigten Atmungskette von *Neurospora* wiederum ein Großteil der Atmungsaktivität durch Cyanid nicht gehemmt, wohl aber durch Hydroxamsäurederivate.

Die cyanidunempfindliche Endoxidase von *Neurospora* könnte mit der cyanidunempfindlichen Endoxidase von höheren Pflanzen weitgehend identisch sein.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine nähere Charakterisierung der verzweigten Atmungskette vorzunehmen.

Es sollte insbesondere die Atmungskettenkomponente identifiziert werden, die als Redoxüberträger mit der cyanidunempfindlichen Endoxidase substratseitig reagiert, d.h. festgestellt werden, welche Komponente den eigentlichen Verzweigungspunkt des Elektronenflusses in dieser Atmungskette darstellt.

Anschließend wurden, zur eingehenderen Aufklärung der Funktion der b-Typ Cytochrome, vergleichende Studien an der unverzweigten Atmungskette von *Neurospora* Wildtyp und an der verzweigten Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps durchgeführt.

Als wichtige Hilfsmittel dienten verschiedene natürliche Substrate, wie NADH und Succinat, sowie der künstliche Redoxmediator Durochinon in seiner reduzierten oder oxidierten Form. Bei der Wahl der verschiedenen Elektronendonatoren waren die unterschiedlichen Eintrittsstellen der Elektronen in die Atmungskette von Bedeutung.

Wesentliche neue Erkenntnisse konnten gewonnen werden, als bei den Untersuchungen neben KCN, als Inhibitor von Cytochrom a, a_3 , und Salicylhydroxamsäure, als Inhibitor der cyanidunempfindlichen Oxidase, der Hemmstoff Antimycin zur Anwendung gebracht und dessen Wirkung einer näheren Analyse unterzogen wurde.

Sämtliche Experimente wurden im entkoppelten Zustand, nach Zugabe von 1 μ M Carbonylcyanid-4-trifluormethoxy-

phenylhydrazon (FCCP), durchgeführt, um einen Einfluß des Phosphorylierungspotentials auf die Meßergebnisse zu vermeiden.

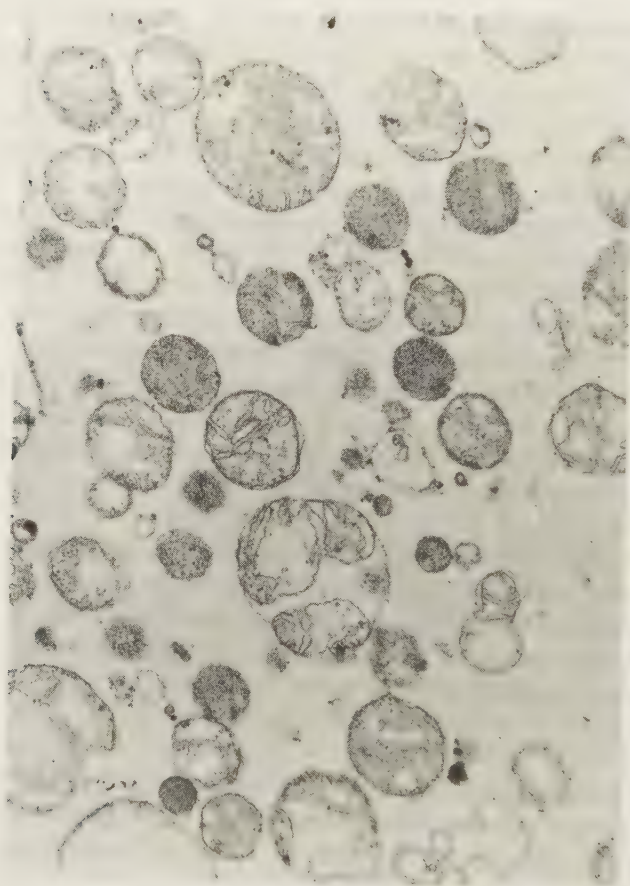


Abb.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Mitochondrien von Neurospora crassa Wildtyp
Schnittfärbung: 20 Min. Magnesiumuranylacetat +
10 Min. Bleifärbung nach Reynolds.

2. Material und Methoden

2.1. Zucht der Hyphen

Hyphen von *Neurospora crassa* Wildtyp (74 A) wurden in Vogels Minimalmedium in 4 oder 8 Liter Flaschen mit zentralem Belüftungsröhr bei 25°C gezüchtet. Die Konidien für die Stammkultur, welche unter sterilen Bedingungen auf Agar Agar Boden heranwuchs, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. F. Kaudewitz, Institut für Genetik der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung von Vogels Medium (50-fach konzentriert) werden in 750 ml destilliertem Wasser nacheinander bei Zimmertemperatur unter Rühren die folgenden Substanzen gelöst: 150 g Natriumcitrat. $2\text{H}_2\text{O}$; 250 g KH_2PO_4 wasserfrei; 100 g NH_4NO_3 wasserfrei; 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH etwa 5.8; 5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 ml Lösung von Spurenelementen; 2.5 ml Biotinlösung (5.0 mg Biotin gelöst in 50 ml 50%igem Äthanol).

Zur Herstellung der Lösung von Spurenelementen werden in 95 ml destilliertem Wasser nacheinander bei Zimmertemperatur unter Rühren die folgenden Substanzen gelöst: 5 g Citronensäure. H_2O ; 5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.05 g H_3BO_3 wasserfrei; 0.05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Vogels Minimalmedium enthält 20 ml Vogels Medium (50-fach konzentriert) und 40 ml einer 50%igen Saccharose-Lösung pro Liter.

Zur Herstellung des Bodens für die Stammkultur werden in 960 ml destilliertem Wasser die im folgenden angegebenen

Substanzen: 20 ml Vogels Medium, 10 ml Glycerin, 10 ml Vitaminlösung, 2.5 g Hefextrakt, 1 g Caseinhydrolysat und 15 g Agar Agar unter Rühren erhitzt und gelöst, in 300 ml Erlenmeyerkolben gegossen und, nach dem Abdecken der Kolben mit Schaumstoff und Aluminiumfolie, bei 120°C 5 Minuten lang autoklaviert.

Die Vitaminlösung enthält in einem Liter destilliertem Wasser: 10 mg Thiaminiumdichlorid (Vitamin B₁-hydrochlorid), 5 mg Riboflavin, 5 mg Pyridoxin, 50 mg Calcium-D(+)pantothenat, 5 mg 4-Aminobenzoesäure, 5 mg Nicotinsäureamid, 100 mg Cholinchlorid, 1 mg Folsäure und 100 mg Inositol.

Die Stammkultur wird ca. 7 Tage bei 25°C im Brutschrank gezogen, dann werden die Konidien geerntet, in destilliertem Wasser aufgenommen, in einer Erythrozyten-Zählkammer ausgezählt und mit Wasser auf 10⁸ Konidien/ml verdünnt.

Zur Bestimmung der Wachstumskurven der Hyphen (Abb. 2) wurden aus den Kulturflaschen in Abständen von zwei Stunden 10 ml Proben entnommen, mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG, Staufen i.Br.) homogenisiert und die Extinktion der Suspension im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen.

Die Hyphen wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase des Pilzes geerntet, d.h. die Wildtyp-Hyphen nach 21 Stunden, die Hyphen des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps nach 23 Stunden.

Chloramphenicol ad us.vet., bezogen von der Fa. Bayer, Leverkusen, wurde in 50%igem Methanol gelöst und dem Kulturmedium zugegeben.

Zum Ernten wurden die Hyphen abgenutscht und mit kaltem

destillierten Wasser nachgespült, dann sofort neu aufgenommen in 200-300 ml Isolationsmedium und in einem Braun Mixer bei Stufe I (niedrigste Stufe) ca. 1 Minute lang zerkleinert. Die danach erhaltene Suspension wurde zur Untersuchung der frischen Hyphen direkt verwendet oder zur Isolierung der Mitochondrien weiterverarbeitet.

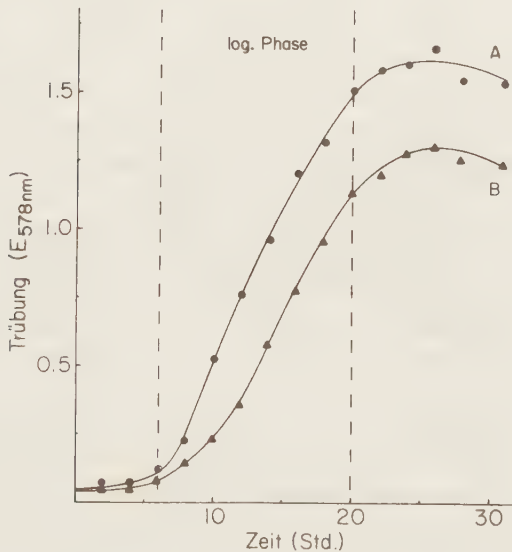


Abb.2 Wachstumskurven des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps A) Wildtyp, B) Chloramphenicol-gezüchteter Wildtyp, gezogen mit 2 g/l Chloramphenicol. Es wurden Hyphenproben aus einem 8 Liter Zuchtansatz entnommen und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Die Extinktion der Suspension wurde im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen. log.Phase = logarithmische Phase.

Das Isolationsmedium (Isolationsmedium I) enthielt 0.3 M Saccharose, 10 mM Tris-Acetat Puffer pH 7.3, 2 mM EGTA und 0.2% Rinderserumalbumin.

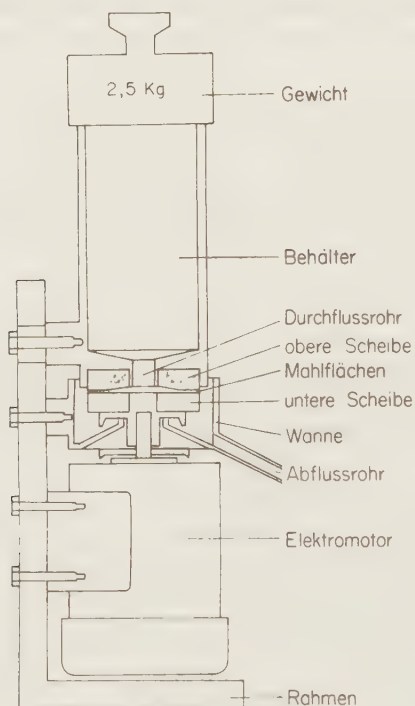


Abb.3 Schema der Korundscheiben-Mühle Maßstab 1:5. Die Kleinschleifscheiben sind aus Edelmetallkorund (8580 k, Fa. Kratsch, München). Die obere Scheibe ist mit Hilfe von vier Schrauben in einer Vertiefung am unteren Ende des Behälters befestigt. Die untere Scheibe ist über ein Aluminiumrad fest mit dem Elektromotor (1350 U/Min. 130 Watt) verbunden. Der Behälter wurde aus Plexiglas, der Rahmen und die Wanne aus Polyvinylchlorid hergestellt (22).

2.2. Präparation der Mitochondrien

Zur Präparation der Mitochondrien wurden die Zellen in einer speziell für diesen Zweck angefertigten Korund-scheiben-Mühle aufgeschlossen (22). Die Mühle (Abb. 3) ermöglicht das Aufbrechen der sehr widerstandsfähigen, heteropolysaccharidhaltigen Zellwände bei großer Ausbeute an unbeschädigten Mitochondrien.

Durch fraktionierte Zentrifugation wurden die Mitochondrien isoliert: Erst wurden nach 10 Min. Zentrifugation bei 3.500 U/Min. die groben Zellbruchstücke und -Kerne abgetrennt; anschließend wurden durch Zentrifugation bei 10.000 U/Min. für 60 Min. die Mitochondrien sedimentiert.

Zur Aufnahme des Sediments diente im allgemeinen das in Kap. 2.1. angegebene Isolationsmedium I. Bei der Durchführung der Ubichinon-Extraktions-Reinkorporationsexperimente (vergl. Kap. 2.4.) wurde anstelle von 0.3 M Saccharose 0.15 M KCl verwendet (Isolationsmedium II).

Die Reinheit der Präparation und die Intaktheit der Mitochondrien wurden in regelmäßigen Zeitabständen elektronenmikroskopisch geprüft. Eine typische Aufnahme einer Mitochondrienpräparation, wie sie nach der hier beschriebenen Methode erhalten wurde, ist in Abb. 1 zu sehen. Die Abbildung zeigt, daß wenig Verunreinigungen durch andere Zellorganellen vorliegen und daß die isolierten Mitochondrien von einheitlicher Größe sind.

2.3. Präparation der submitochondrialen Partikel

Zur Präparation der submitochondrialen Partikel wurden die Mitochondrien in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, über-

geführt und auf ca. 5 mg/ml Proteinkonzentration verdünnt. Sie wurden insgesamt 60 Sekunden (12 x 5 Sek.) bei 0°C beschallt. Nach zweimaliger Zentrifugation (bei 10.000 U/Min. für 10 Min. und 40.000 U/Min. für 60 Min.) wurde das Sediment der zweiten Zentrifugation in Isolationsmedium I (vergl. Kap. 2.1.) aufgenommen.

Die Präparation von Schallpartikeln des Wildtyps zeigte Atmungsaktivitäten, die in gleicher Weise wie die Atmungsaktivitäten von Mitochondrien des Wildtyps cyanidhemmbar waren.

Bei der Präparation von Schallpartikeln aus Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps stellte es sich hingegen heraus, daß durch das Beschallen die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität verlorengeht.

Die Ursache für die Inaktivierung der cyanidunempfindlichen Oxidase ist noch nicht geklärt. Auf die offestehenden Fragen zu diesem Thema soll in der Diskussion bei der Besprechung der möglichen Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase eingegangen werden.

Die Tatsache, daß die cyanidunempfindliche Oxidase inaktiviert wird, erwies sich jedoch im Verlaufe der weiteren Untersuchungen von großem Vorteil. Durch das Beschallen von Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps gewinnt man eine in Bezug auf ihre Atmungsaktivität wie beim Wildtyp unverzweigte Atmungskette, welche sich aber in Bezug auf die Gehalte ihrer einzelnen Komponenten erheblich von der Atmungskette des Wildtyps unterscheidet. Dieses neue System ist zur Lösung bestimmter Fragestellungen besonders gut geeignet. Submitochondriale Partikel des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps wurden z.B. bei der Bestimmung des Redoxzustands von Ubichinon (Kap.2.6.3. und 3.3.5.) als nützliches Untersuchungsmaterial verwendet.

2.4. Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation

In Anlehnung an Ernster et al. (73) wurde die Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation in einem Vorversuch mit submitochondrialen Partikeln des Wildtyps durchgeführt. Anschließend wurde die Methode erweitert und auf intakte Mitochondrien angewandt. Dies ermöglichte die Untersuchung der verzweigten Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps ohne eine vorherige Inaktivierung der cyanidunempfindlichen Oxidase durch das Beschallen.

Die Mitochondrien, aufgenommen in Isolationsmedium II (vergl. Kap. 2.2.), wurden über Nacht lyophilisiert, dann in einer vorgetrockneten Reibschale zerrieben und in ca. 5 ml wasserfreiem Pentan aufgenommen und vorsichtig homogenisiert. Auf Trockenheit muß äußerst sorgfältig geachtet werden. Es erwies sich, daß Spuren von Wasser eine quantitative Extraktion des Ubichinons verhindern.

Zur Herstellung von wasserfreiem Pentan wurde das Pentan mit Na_2SO_4 vorgetrocknet, und vor Gebrauch mit reinem, zu Fäden gepreßtem Natrium versetzt, insgesamt dreimal in Abständen von etwa 8 Stunden, bis keine Bläschenbildung mehr festzustellen war.

Zur Ubichinon-Extraktion wurde die Mitochondriensuspension im Extraktionsglas mit Schliffstopfen insgesamt 3 Minuten bei 0°C geschüttelt. Dann wurde der Pentanextrakt durch Zentrifugation und anschließendes Abdekantieren von den Zellorganellen getrennt. Nach Zugabe von frischem Pentan wurde die Prozedur insgesamt viermal wiederholt. Der Niederschlag wurde nach der letzten Zentrifugation im Vakuum-Rotationsverdampfer 30 Minuten bei Zimmertemperatur getrocknet, und somit das restliche Pentan entfernt.

Eine Probe der Ubichinon-extrahierten Mitochondrien wurde zur Bestimmung der Atmungsaktivität in Isolationsmedium I aufgenommen.

Der Rest wurde zur Ubichinon-Reinkorporation in 300 μ l Pentan aufgenommen und mit einer Lösung von Ubichinon-9 (Gratismuster der Fa. Hoffmann-la-Roche & Co., Basel) zu einer Konzentration von 50 nMol Ubichinon/mg Protein versetzt. Das Gemisch wurde 30 Min. in der Kälte geschüttelt. Der Überschuß an gelöstem Ubichinon wurde durch Zentrifugieren und vorsichtiges Abdekantieren von dem Mitochondriensediment getrennt. Das Pentan wurde vollends durch Trocknen am Vakuum-Rotationsverdampfer entfernt. Zur Messung der Ubichinon-reinkorporierten Mitochondrien wurden diese wieder in Isolationsmedium I aufgenommen.

2.5. Präparation von Durohydrochinon

Die Präparation von Durohydrochinon (Tetramethyl-p-benzohydrochinon) gelang nach einer geringfügig modifizierten Methode nach H. Aquila (74): Zinn-II-Chlorid. $2\text{H}_2\text{O}$ wurde in ca. 50 ml Eisessig unter Zugabe von HCl im siedenden Wasserbad gelöst. Dann wurde 16.4 g (0.10 Mol) Durochinon (Fa. Merck, Darmstadt) ebenfalls in ca. 50 ml Eisessig gelöst und zur Zinn-II-Chlorid-Lösung langsam zugegeben. In der anfangs klaren Lösung fiel nach Zugabe einer größeren Menge Durochinon ein hellgelber Niederschlag aus. Die vollständige Fällung wurde durch weiteres Ansäuern mit Salzsäure erreicht. Nach ca. 1/2 Stunde wurde die kalte Suspension abgesaugt und der Rückstand mit 2N HCl gewaschen, bis im Filtrat bei Zugabe von NH_3 -Lösung keine Trübung mehr auftrat. Anschließend wurde trockengesaugt, das Rohprodukt aus Äthanol umkristallisiert, die Kristalle abgesaugt und mit Äthanol gewaschen.

Zur endgültigen Entfernung der Essigsäure wurde die Präparation im Exsikkator über KOH getrocknet.

Der Schmelzpunkt des Präparates lag bei 225-230°C. Die Reinheit des Präparates wurde spektrophotometrisch geprüft. Zur Darstellung der Absorptionsspektren siehe Kap. 2.6.3. Abs. III.

2.6. Bestimmungsmethoden

2.6.1. Amperometrische Bestimmung der Atmungsaktivität

Die Atmungsaktivität der Mitochondrien wurde in einem speziellen Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode amperometrisch registriert.

Als Reaktionsmedium diente eine Lösung von 0.3 M Saccharose, 10 mM Tris-Acetat Puffer pH 7.4, 2 mM EGTA, 0.2% Rinderserumalbumin, 10 mM Na_2HPO_4 -Puffer und 10 mM MgSO_4 . Die Versuchstemperatur war 25°C.

Das Reaktionsgefäß enthielt 0.5 ml des Reaktionsmediums, welches bei Sauerstoffsättigung und der angegebenen Temperatur etwa 225 μAtom Sauerstoff entspricht.

Die Zugabe der Substrate und Hemmstoffe erfolgte in sehr kleinen Volumina (5-10 μl), um die Veränderung des Endvolumens möglichst niedrig zu halten. NADH (reduziert) wurde in 2%iger Natriumbicarbonatlösung, Succinat und KCN in Wasser, Salicylhydroxamsäure (Koch-Light Lab.Engl.), Antimycin (Tokyo Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Japan) und Durohydrochinon in Äthanol gelöst.

Die Atmungsaktivität wurde in $\mu\text{Atom Sauerstoff} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$ berechnet.

2.6.2. Spektrophotometrische Bestimmung der Cytochrom- gehalte

Die Cytochrome wurden mit Hilfe von Differenzabsorptionsspektren (reduzierter minus oxidierten Zustand) an einem von M. Klingenberg nach B. Chance speziell für trübe Lösungen (wie etwa Mitochondriensuspensionen) entworfenen Split Beam Spektrophotometer (75) gemessen: Durch eine Doppelküvette, in der sich das Meßgut auf der Meßseite im reduzierten, auf der Vergleichsseite im oxidierten Zustand befindet, geht ein monochromatischer Lichtstrahl, welcher vor der Küvette gespalten wird, alternierend durch beide Seiten der Küvette. Anschließend wird elektronisch die Absorption der oxidierten Seite von der der reduzierten Seite abgezogen. In dem so ermittelten Differenzspektrum fällt die hohe Grundabsorption der Mitochondriensuspension weg.

Es besteht die Möglichkeit, die Cytochrome in ihrer Gesamtheit oder isoliert darzustellen, indem man durch gezielte Substrat- oder Hemmstoffzugaben unterschiedliche Reduktionszustände einstellt. Beispiele für die Reduktion einzelner Cytochrome sind in Abb. 4 gezeigt. Das Schema zeigt, daß auch membrangebundene Cytochrome, welche bis jetzt noch nicht präparativ isoliert zur Verfügung stehen (die b-Typ Cytochrome und Cytochrom c_1), spektrophotometrisch isoliert dargestellt werden können.

Die Cytochrome können bei Raumtemperatur oder in sogenannten Tieftemperatur-Spektren gemessen werden. Das Tieftemperatur-Spektrum besitzt einige Vorzüge gegenüber dem Raumtemperatur-Spektrum: Zur Durchführung dieses Spektrums wird die Probe in 0.5 M Saccharose-Lösung bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie geht dann von einem flüssigen in einen mehr kristallinen Zu-

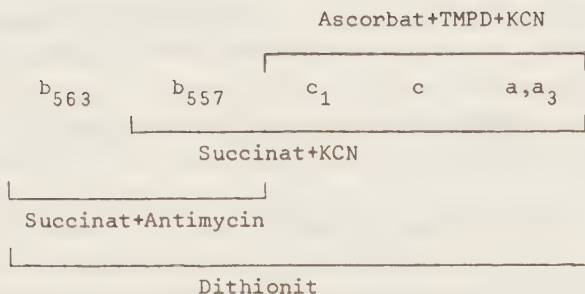


Abb.4 Schema zur Darstellung der Cytochrome mit Hilfe von Differenzabsorptionsspektren Einzelne Cytochrome werden gezielt durch die Zugabe von Substraten entsprechender Mittelpotentiale und spezifischen Hemmstoffen reduziert. Die Reduktion sämtlicher Cytochrome erfolgt nach Zugabe von Dithionit. Die Anordnung der Cytochrome in diesem Schema soll lediglich dem Verständnis dienen und nicht eine funktionelle Reihenfolge der Cytochrome in der Atmungskette wiedergeben.
TMPD = N,N,N,N Tetramethylphenylendiamin

stand über (76). Dadurch werden alle enzymatischen und physikochemischen Reaktionen auf ein Minimum herabgesetzt, d.h. der Zustand, in dem das Spektrum erfasst wird, bleibt während der Messung nahezu unverändert. Außerdem wird eine schärfere Auflösung der einzelnen Absorptionsbanden im Gesamtspektrum erzielt, bedingt durch eine Verschmälerung der Banden, deren Ursache in einer Herabsetzung der thermischen Elektronenbewegung zu suchen sein dürfte (76). Bei Neurospora gelingt es, die b-Typ Cytochrome, die ihr Maximum bei der Temperatur von -196°C bei 557 nm und 563 nm haben, im Tieftemperaturspektrum einzeln darzustellen.

Es wurde ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Cytochrome, unter Berücksichtigung ihrer gegenseitigen Absorptionsinterferenzen, entwickelt (26). Die angegebenen Cytochromgehalte wurden mit dieser Bestimmungsmethode berechnet.

Als Differenz-Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

$$\begin{aligned}\Delta \epsilon_{605-630\text{nm}} &= 24.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ für Cytochrom a, a}_3 \text{ (77),} \\ \Delta \epsilon_{560-575\text{nm}} &= 23.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ für Cytochrom b (78) und} \\ \Delta \epsilon_{550-542\text{nm}} &= 18.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ für Cytochrom c (79).}\end{aligned}$$

2.6.3. Bestimmung des Redoxzustands von Ubichinon

I. Extraktion des konstitutiven Ubichinons: Die Ubichinonbestimmung wurde im Prinzip nach der Extraktionsmethode von Kröger et al. (80) durchgeführt.

Es wurden 2-5 mg Mitochondrienprotein mit 2.5 ml Methanol/Petroläther (60:40) in einem Schliffglas geschüttelt und anschließend 2 Min. zentrifugiert. Die Petrolätherphase im Überstand wurde mit Hilfe einer Sicherheitspipette abgehoben, die Methanolphase nochmals mit ca. 1 ml Methanol/Petroläther versetzt, 2 Min. zentrifugiert und wiederum abpipettiert. Bei dieser Behandlung wird das Ubichinon bekanntlich quantitativ aus den Mitochondrien in die Petrolätherphase extrahiert; hydrophile Verbindungen, wie etwa wasserlösliche Substrate oder Cytochrom c, gehen in die Methanolphase über. Der Petroläther wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer eingedampft, das Ubichinon im Rückstand in 3 ml Äthanol/Heptan (75:25) aufgenommen.

Der Gehalt an oxidiertem Ubichinon wurde durch Reduktion mit KBH_4 spektrophotometrisch bestimmt (s.u.). Der Gehalt

an reduziertem Ubichinon ergab sich aus der Differenz von Gesamtgehalt minus gemessenem Wert.

II. Das Verhalten von Durohydrochinon bei der Extraktion: Bei der Verwendung von Durohydrochinon als Elektronendonator für die Ubichinonreduktion war zu vermeiden, daß Durohydrochinon bei der Messung interferierte.

Zur Kontrolle wurde die Verteilung von Durohydrochinon im Methanol/Petroläther (60:40) Gemisch untersucht: 100 μ M Durohydrochinon in 2.5 ml Methanol/Petroläther wurden geschüttelt und 2 Min. zentrifugiert. Dann wurden die Methanol- und die Petrolätherphase getrennt und die Absorption der beiden Proben spektrophotometrisch bestimmt. Es zeigte sich, daß Durohydrochinon quantitativ in die Methanolphase extrahiert wird. Eine nicht-enzymatische Reduktion von Ubichinon in der Petrolätherphase durch Durohydrochinon kann demnach ausgeschlossen werden.

III. Chinonspektren: Die Absorptionsspektren von Ubichinon und Durochinon wurden als Differenzspektren in einem Cary 118 Spektrophotometer registriert.

Zur Darstellung der Absolutspektren von Durochinon und Durohydrochinon in wäßriger und in äthanolischer Lösung (Abb. 5) diente als Leerwert in der Vergleichsküvette Wasser bzw. Äthanol. Es erwies sich bei dieser Messung, daß das Spektrum des Durohydrochinon-Präparates (vergl. Kap. 2.5.) mit dem Durohydrochinonspektrum, welches nach Reduktion von Durochinon durch KBH_4 erhalten wird, identisch war.

Bei der Darstellung der Differenzspektren (oxidiert minus reduziert) von Ubichinon-9 und Durochinon in ätha-

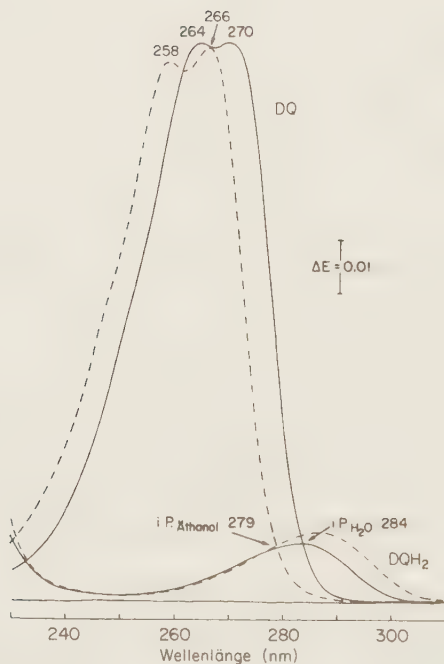


Abb.5 Absorptionsspektren von Durochinon und Durchydrochinon in wäßriger und in äthanolischer Lösung (—) wäßrige Lösung, (---) äthanolische Lösung. Die Messung wurde an einem Cary Spektrophotometer, Modell 118, durchgeführt. Der Lichtweg war 1 cm. Eine konzentrierte Lösung (10 mM) von Durochinon in Äthanol wurde in Wasser bzw. Äthanol auf eine Endkonzentration von 40 μ M gebracht. Es wurde zuerst die oxidierte Form (DQ) gemessen. Anschließend wurde die Probe durch Zugabe von Kaliumborhydrid reduziert (DQH₂). Als Leerwert in der Vergleichsküvette diente Wasser bzw. Äthanol. i.P. = isosbestischer Punkt.

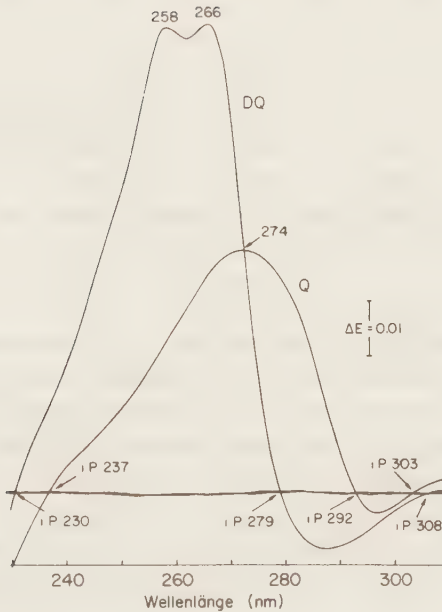


Abb.6 Differenzabsorptionsspektren von Ubichinon und Durochinon in äthanolischer Lösung Ubichinon-9 (Q) und Durochinon (DQ) waren in Äthanol zu einer Endkonzentration von $40 \mu\text{M}$ gelöst. Die Messung wurde an einem Cary Spektrophotometer, Modell 118, durchgeführt. Der Lichtweg war 1 cm. Zur Darstellung der Spektren (oxidiert minus reduziert) wurde jeweils die Probe in der Vergleichsseite durch Zugabe von Kaliumborhydrid reduziert. i.P. = isosbestischer Punkt.

nolischer Lösung (Abb. 6) befand sich die jeweilige Probe in der Meßküvette im oxidierten Zustand, in der Vergleichsküvette wurde sie durch Zugabe von KBH_4 reduziert.

IV. Durchführung der Messung: Die Ubichinon-Extrakte wurden in einem Perkin-Elmer 165 Doppelstrahlspektrophotometer, welches mit einer Deuteriumlampe als Lichtquelle im UV-Bereich ausgestattet ist und eine kontinuierliche Wellenlängeneinstellung erlaubt, bei dem Wellenlängenpaar 279-308 nm gemessen.

Wie an Hand des Differenzspektrums in Abb. 6 zu erkennen ist, liegen bei 279 nm und 308 nm die isosbestischen Punkte von Durochinon in äthanolischer Lösung. Durohydrochinon als Elektronendonator im 20-fachen molaren Überschuß interferierte spektrophotometrisch nicht bei den Ubichinonbestimmungen.

Als Extinktionskoeffizient für Ubichinon (oxidiert minus reduziert) wurde verwendet: $\Delta\epsilon_{279-308\text{nm}} = 11.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.6.4 Spektrophotometrische Methodik bei Antimycin-titrationsen

Die Bestimmung der Durohydrochinon-Oxidationsrate, der Durochinon-Reduktionsrate und des Redoxgrades von Cytochrom b_{563} in den Antimycin-Titrationsexperimenten wurden am Perkin-Elmer 156 Doppelstrahlspektrophotometer als Direktmessungen durchgeführt.

Die Durohydrochinon-Oxidation und die Durochinon-Reduktion wurden bei dem Wellenlängenpaar 270-284 nm registriert.

Das Absorptionsspektrum von Durochinon in wäßriger Lösung ist im Vergleich zu dem von Durochinon in äthanolischer Lösung um 5 nm in den langwelligeren Lichtbereich verschoben. Es hat bei 270 nm ein Maximum, bei 284 nm einen isosbestischen Punkt (vergl. Abb. 5).

Als Extinktionskoeffizient für Durochinon (oxidiert minus reduziert) wurde verwendet: $\Delta \epsilon_{270-284\text{nm}} = 16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Die Reduktion von Cytochrom b_{563} wurde bei dem Wellenlängenpaar 562-575 nm mit einer Wolframlampe im Doppelstrahlspektrophotometer gemessen.

Als Reaktionsmedium diente das bei der Bestimmung der Atmungsaktivität (vergl. 2.6.1.) verwendete Medium.

Die Versuchstemperatur war 25°C.

Es wurde eine Quarzküvette von 2 mm Schichtdicke mit 0.5 ml Inhalt verwendet und wiederum streng auf die Zugabe von Substraten und Hemmstoffen in sehr kleinen Volumina geachtet, um Verdünnungseffekte zu vermeiden.

Die Antimycinzugaben erfolgten mit Hilfe einer Pedersen Pipette.

2.6.5. Proteinbestimmung

Das Protein wurde mit der modifizierten Methode nach Biuret gemessen (81).

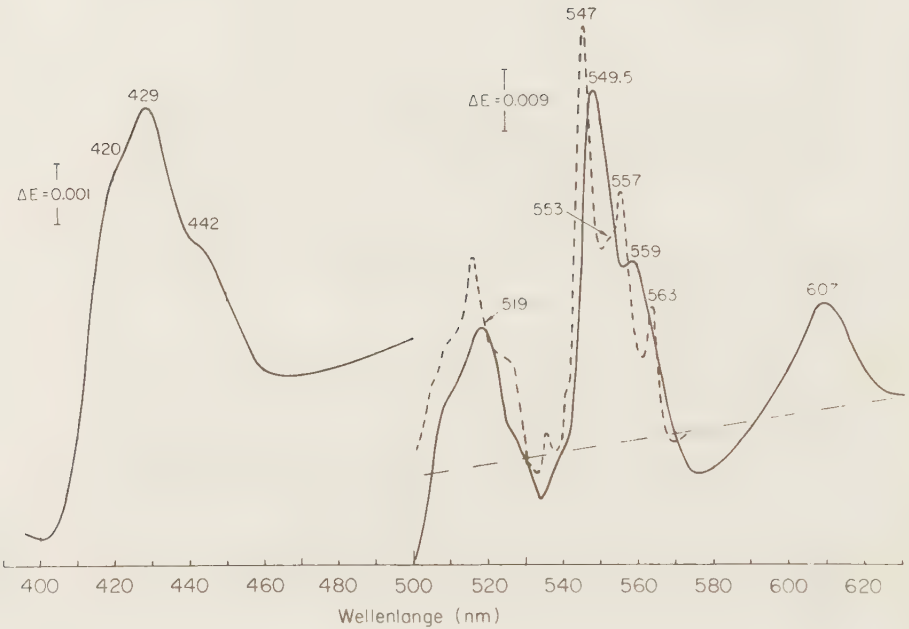


Abb.7 Differenzabsorptionsspektren der Cytochrome von Mitochondrien des Wildtyps bei Raum- und Tieftemperatur Die Spektren wurden bei 25°C (—) und bei -196°C (---) im Split Beam Spektrophotometer (75) registriert. Der Lichtweg war 5 mm bei Raumtemperatur und 2 mm bei Tieftemperatur. In der Meßseite wurde der anaerobe Zustand durch Zusatz von Dithionit eingestellt; die Vergleichsseite war im aeroben Zustand, ohne Zugaben.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Die Veränderung der Cytochromgehalte bei Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese

Der Aufbau der Atmungskette von *Neurospora* ist in den letzten Jahren insbesondere von zwei Arbeitsgruppen genauer untersucht worden (25,26,32,33,34). Dabei dienten u.a. die Lichtabsorptionsspektren der Cytochrome zu ihrer näheren Charakterisierung und zur Bestimmung der Cytochromgehalte und deren Stöchiometrie.-

Wesentliche Übereinstimmung wurde erzielt bei der Zuordnung der Absorptionsbanden zu den betreffenden Cytochromen und in Bezug auf die Cytochromgehalte. In den beiden folgenden Kapiteln sollen die Cytochrome des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps beschrieben werden.

Eine noch offenstehende Frage betraf die Aufrechterhaltung der äquimolaren Stöchiometrie der beiden b-Typ Cytochrome unter allen Bedingungen. Sie soll im letzten Kapitel dieses Abschnitts abgehandelt werden.

3.1.1. Die Cytochromspektren des Wildtyps

Abb. 7 zeigt die Gesamtycytochromspektren im α - und im β -Bereich von Mitochondrien des Wildtyps, durchgeführt bei 22°C Raumtemperatur (durchgezogene Linie) und bei -196°C in flüssigem Stickstoff (gestrichelte Linie).

Die Spektren geben die Absorption aller Cytochrome nach ihrer vollständigen Reduktion durch Dithionit wieder.

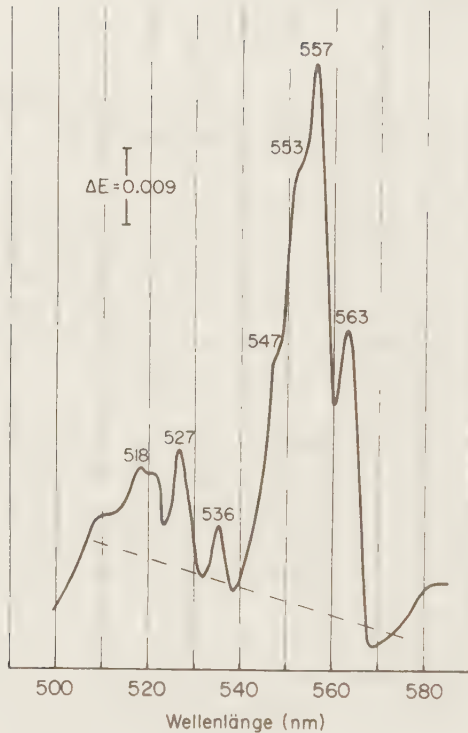


Abb.8 Tiefemperatur-Differenzabsorptionsspektrum der Cytochrome von submitochondrialen Partikeln des Wildtyps Die Partikel wurden nach Beschallung der Mitochondrien in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, erhalten. Zur Messung diente ein Split Beam Spektrophotometer (75). In der Meßseite wurde der anaerobe Zustand durch Zusatz von Dithionit eingestellt; die Vergleichsseite war im aeroben Zustand, ohne Zugaben.

Das Raumtemperaturspektrum zeigt auf der langwelligen Seite im Bereiche der α -Banden eine isolierte breite Bande, deren Maximum bei 607 nm liegt. Diese Bande wird von Cytochrom a, a_3 hervorgerufen. Auf der kurzwelligen Seite schließen sich zwei Banden an, die sich zum Teil überlappen. Die Schulter bei 559 nm wird durch die b-Typ Cytochrome, die große Bande bei 549.5 nm durch die c-Typ Cytochrome hervorgerufen. Die β -Banden der Cytochrome liegen im Wellenlängenbereich zwischen 540 und 500 nm.

Im Tieftemperaturspektrum kommt es zu einer besseren Auftrennung der α - und β -Banden der einzelnen Cytochrome. Die Absorption von Cytochrom a, a_3 konnte bei Tieftemperatur nicht untersucht werden, weil die zu geringe Lichtintensität des zur Verfügung stehenden Gerätes eine Messung in diesem Bereich nicht erlaubt.

Die Schulter der b-Typ Cytochrome, die bei Raumtemperatur bei 559 nm liegt, spaltet bei -196°C in zwei Banden mit Maxima bei 563 nm und 557 nm auf. Die Cytochrom c-Bande spaltet ebenfalls auf. Es wird bei 553 nm eine Schulter sichtbar, die dem Cytochrom c_1 zugeordnet werden kann. Cytochrom c zeigt sein charakteristisches Maximum bei 547 nm (82).

Abb. 8 zeigt das Tieftemperaturspektrum von submitochondrialen Partikeln des Wildtyps. Vergleicht man dieses Spektrum mit dem Spektrum der nicht beschallten Mitochondrien (Abb. 7), so wird deutlich, daß die Bande von Cytochrom c mit ihrem Maximum bei 547 nm verschwunden ist. Die Schulter bei dieser Wellenlänge im Partikelspektrum dürfte durch Cytochrom c_1 hervorgerufen werden und nicht durch Cytochrom c, da bei der Partikelpräparation Cytochrom c vollständig aus der Membran herausgelöst wird. Es gelingt somit, Cytochrom c_1 , welches sonst durch die Absorptionsbande von Cytochrom c stark überlagert ist,

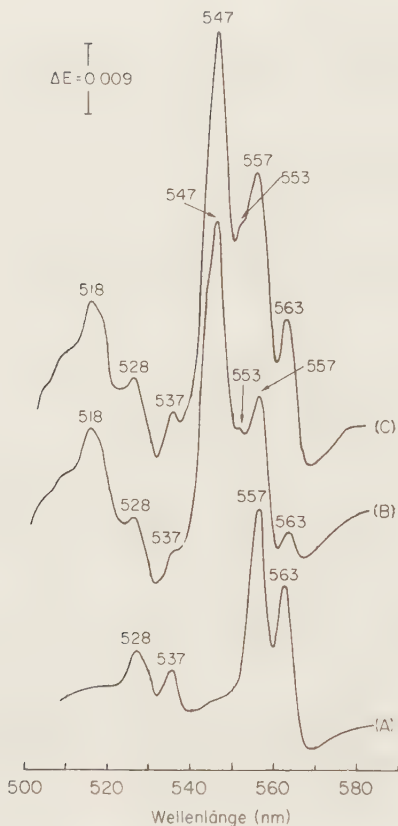


Abb.9 Charakterisierung der b-Typ Cytochrome von Neurospora bei -196°C Spektrum (A) Antimycin-gehemmter Zustand. Meßseite: Zusatz von 5 mM Succinat und 1 μM Antimycin; Vergleichsseite: aerober Zustand, ohne Zugaben. Spektrum (B) KCN-gehemmter Zustand. Meßseite: Zusatz von 5 mM Succinat und 1 mM KCN; Vergleichsseite: aerober Zustand, ohne Zugaben. Spektrum (C) Vergleichsspektrum. Meßseite: anaerober Zustand nach Zusatz von Dithionit; Vergleichsseite: aerober Zustand, ohne Zugaben. Als Untersuchungsmaterial dienten Mitochondrien des Wildtyps.

mit einer Schulter bei 553 nm deutlich sichtbar darzustellen.

Eine Differenzierung zwischen den b-Typ und den c-Typ Cytochromen ist bei Anwendung bestimmter Substrate und spezifischer Hemmstoffe möglich. Dies ist in Abb. 9 gezeigt. Zur Darstellung der Spektren dienten Mitochondrien des Wildtyps.

Spektrum C in Abb. 9 zeigt lediglich nochmals ein Gesamtspektrum, wie für Abb. 7 beschrieben, zum Vergleich.

Der Hemmstoff Antimycin blockiert den Elektronentransport der Cytochromketten zwischen den b-Typ Cytochromen und Cytochrom c_1 (83,84). Durch Zugabe eines Substrats wie etwa Succinat in Gegenwart von Antimycin wird in der Mitochondriensuspension ein Zustand, welcher fortan als "Antimycin-gehemmter Zustand" bezeichnet werden soll, eingestellt. Im Spektrum erscheinen die zwei b-Typ Cytochrome isoliert mit ihren Maxima bei 563 nm (Cytochrom b_{563}) und 557 nm (Cytochrom b_{557}) im α -Bereich und zwei Banden bei 537 nm und 528 nm im β -Bereich (Abb. 9A).

Eine weitere Differenzierung zwischen den b-Typ Cytochromen ist in einem Spektrum möglich, bei dessen Darstellung die Mitochondriensuspension nach Zusatz von Succinat in Gegenwart von KCN in einem Zustand, welcher fortan als "KCN-gehemmter Zustand" bezeichnet werden soll, vorliegt. In diesem Spektrum (Abb. 9B) erscheinen die c-Typ Cytochrome beinahe quantitativ, von den beiden b-Typ Cytochromen erscheint jedoch nur noch Cytochrom b_{557} .

Das letztgenannte Spektrum besagt, daß Cytochrom b_{563} durch Succinat in Gegenwart von KCN nicht reduziert

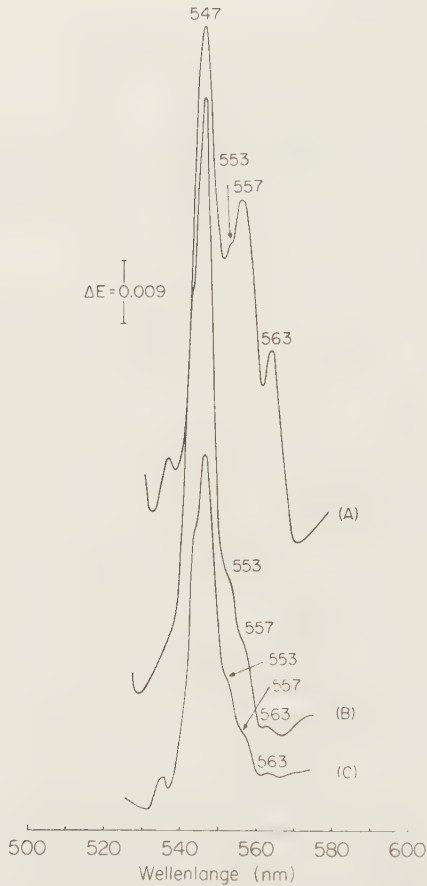


Abb.10 Tiefemperatur-Differenzabsorptionsspektren der b- und c-Typ Cytochrome von Mitochondrien des Wildtyps, des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps und der *mi-1* Mutante Spektrum (A) Wildtyp. Spektrum (B) Chloramphenicol-gezüchteter Wildtyp, gezogen mit 4 g/l Chloramphenicol. Spektrum (C) *mi-1* Mutante. Dieses Spektrum wurde zum Vergleich übernommen aus (26).

werden kann. Das Redoxpotential von Cytochrom b_{563} ist offensichtlich negativer als das von Cytochrom b_{557} . Die Reduktion von Cytochrom b_{563} in Gegenwart von Antimycin mit Succinat als Redoxpartner kann eigentlich nur erklärt werden durch die Annahme, daß Antimycin eine Veränderung des Redoxpotentials von Cytochrom b_{563} hervorruft. Es konnte jedoch bisher noch kein eindeutiger experimenteller Beweis hierfür erbracht werden.

3.1.2. Die Cytochromspektren des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps

Beim Vergleich des Tieftemperatur-Gesamtcytochromspektrums von Neurospora Wildtyp mit dem eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps lassen sich erhebliche Unterschiede in der Größe der Absorptionsbanden feststellen.

In Abb. 10 sind die Spektren von Mitochondrien des Wildtyps (Spektrum A), eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 4 g/l Chloramphenicol (Spektrum B) und der mi-1 Mutante von Neurospora (Spektrum C) aufgeführt. Es wird daraus ersichtlich, daß tatsächlich, nach Zugabe von hohen Chloramphenicol-Konzentrationen (3-4 g/l) zum Kulturmedium des Wildtyps, das Cytochromspektrum des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps mit dem der mi-1 Mutante große Ähnlichkeit aufweist.

Die Veränderung der Cytochrome ist in früheren Arbeiten bereits untersucht worden (39,31,26). Es wurde gezeigt, daß in der mi-1 Mutante und im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp verglichen mit dem Wildtyp der Gehalt der c-Typ Cytochrome ansteigt, während der Gehalt der b-Typ Cytochrome abnimmt und Cytochrom a, a_3 fast vollständig verlorenght. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der Unter-

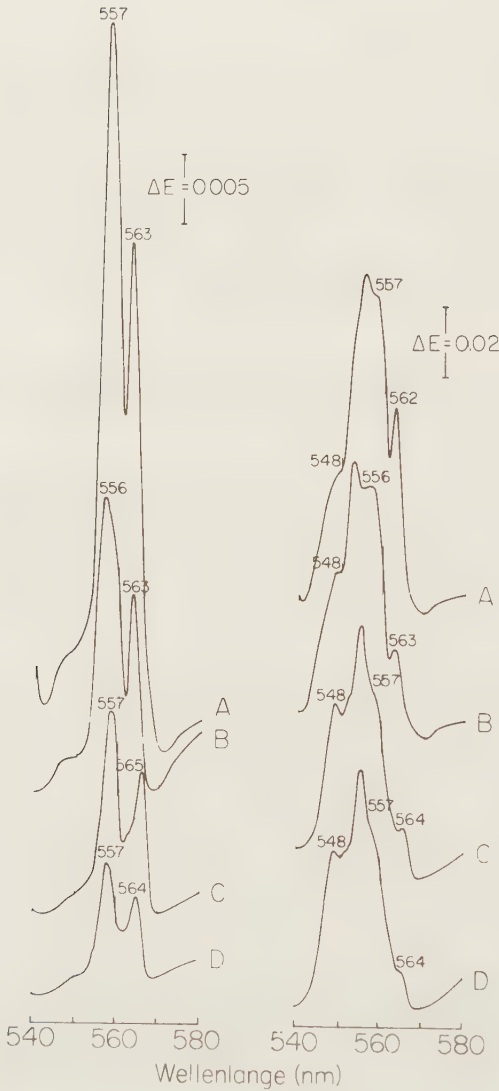


Abb.11 Die Aufrechterhaltung der Äquimolarität der beiden b-Typ Cytochrome Die Erläuterungen zu den Spektren werden im Text gegeben.

suchungen zu dieser Arbeit reproduziert. Die tabellarische Zusammenfassung der Cytochromgehalte wird in Kap. 3.1.3. gegeben.

Einer genaueren Analyse wurden die b-Typ Cytochrome unterzogen. Jagow et al. (34) haben die stufenweise Abnahme der Gehalte der b-Typ Cytochrome im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp bei Zugabe von steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen untersucht. Zur Auswertung dienten Gesamtcytochromspektren, bei denen die vollständige chemische Reduktion aller Cytochrome mit Dithionit durchgeführt wurde. Sie berechneten, daß die Gehalte von Cytochrom b_{563} und Cytochrom b_{557} in unterschiedlichem Maße abnehmen. Lambowitz et al. (85) untersuchten die mi-1 Mutante von Neurospora und fanden, daß nur ein Teil des Dithionit-reduzierbaren Cytochrom b_{557} noch enzymatisch, durch ein Substrat wie Succinat, reduziert werden kann.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Abnahme der Gehalte der b-Typ Cytochrome, mit der Frage nach den jeweils durch Dithionit oder durch Succinat reduzierbaren Anteilen am Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp untersucht.

Es wurde dazu eine Zuchtserie angesetzt, bei der die einzelnen Kulturen mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen gezogen wurden.

Abb. 11 zeigt zwei verschiedene Gruppen von Tieftemperatur-Cytochromspektren, durchgeführt mit submitochondrialen Partikeln des Wildtyps (Spektrum A) und submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 0.5, 2.0 bzw. 3.0 g/l Chloramphenicol (Spektren B,C,D). Die Spektren auf der linken Seite der Abbildung wurden durch Reduktion mit Dithionit, die Spek-

tren auf der rechten Seite durch Reduktion mit Succinat im Antimycin-gehemmten Zustand dargestellt.

Zu erkennen ist in jedem Spektrum eine Bande, welche Cytochrom b_{557} und eine Bande, welche Cytochrom b_{563} zugeordnet werden kann. Das Maximum von Cytochrom b_{563} weist mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen eine Verschiebung um 1-2 nm auf. Es ist noch ungeklärt, ob diese Verschiebung des Maximums eine Veränderung der Molekülstruktur des Cytochroms wiedergibt. Deutlich besagt dagegen die Abnahme der Höhe der Banden, daß die Zugabe von Chloramphenicol eine Verringerung der Gehalte der b-Typ Cytochrome zur Folge hat. Es zeigt sich, daß der Quotient der Absorptionsbanden bei 557 und 563 nm in den Spektren der Dithionit-reduzierten Cytochrome stetig zunimmt, von 1.6 bis auf den Wert von 8.5, während er bei den Spektren der Succinat-reduzierten Cytochrome konstant etwa 1.5 beträgt.

Eine exakte quantitative Aussage zur Veränderung der einzelnen Cytochromgehalte kann nicht durch eine rein visuelle Analyse der Spektren erhalten werden. Die gegenseitigen Absorptionsinterferenzen der Cytochrome, welche nicht direkt erkennbar sind, werden in einem rechnerischen Verfahren berücksichtigt (26).

3.1.3. Die Aufrechterhaltung der Äquimolarität der beiden b-Typ Cytochrome

In Tab. 1 sind die Cytochromgehalte von Mitochondrien des Wildtyps und Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen, angeführt. Die Gehalte wurden mit Hilfe der an Neurospora entwickelten Bestimmungsmethode

Chloramphenicol im Kulturmedium	Cytochromgehalte				
	b ₅₅₇	b ₅₆₃	c ₁	c	a,a ₃
g/l	(μMol / g Protein)				
0	0.40	0.36	0.41	1.08	0.30
1	0.25	0.12	0.38	1.19	0.13
2	0.20	0.04	0.39	1.48	0.05
4	0.20	0.015	P.46	1.77	0.01

Tab.1 Änderung der Cytochromgehalte in Abhängigkeit von der Chloramphenicol-Konzentration Die Cytochromgehalte wurden Spektrophotometrisch bestimmt (26). Zur Darstellung der Spektren für die Berechnung dienten Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit den entsprechenden Chloramphenicol-Konzentrationen.

(26) an Hand von Gesamtytochromspektren der Dithionit-reduzierten Cytochrome (nicht gezeigt) berechnet. Aus den Daten geht hervor, daß mit steigender Chloramphenicol-Konzentration stufenweise der Gehalt der c-Typ Cytochrome zunimmt, während der Gehalt der b-Typ Cytochrome und der Gehalt an Cytochrom a,a₃ abnimmt. Bei einer Konzentration von 3-4 g/l Chloramphenicol ist etwa der maximale Effekt erreicht, d.h. die Cytochromgehalte ändern sich nicht mehr wesentlich.

Diese Tabelle zeigt, daß die Abnahme der Gehalte der beiden b-Typ Cytochrome nicht im gleichen Ausmaße erfolgt. Das Dithionit-reduzierbare Cytochrom b₅₅₇ sinkt auf etwa 50%, das Dithionit-reduzierbare Cytochrom b₅₆₃ auf etwa 6% des Ausgangsgehaltes ab.

In Tab. 2 sind nochmals zum Vergleich die Cytochromgehalte von Mitochondrien des Wildtyps, eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 4 g/l Chloramphenicol, und der mi-1 Mutante zusammengestellt. Zur Berechnung der Gehalte dienten Tieftemperatur-Gesamtcytochromspektren, wie in Abb. 10 angegeben.

Die Daten zeigen, daß die Cytochromgehalte des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps und der mi-1 Mutante annähernd gleich sind.

Mitochondrien- Präparation	Cytochromgehalte				
	b ₅₅₇	b ₅₆₃	c ₁	c	a,a ₃
	(µMol / g Protein)				
Wildtyp	0.40	0.36	0.41	1.08	0.30
CAP-gez. Wildtyp	0.20	0.015	0.46	1.77	0.01
mi-1 Mutante	0.13	0.02	0.39	1.42	<0.02

Tab.2 Cytochromgehalte von Mitochondrien des Wildtyps, des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps und der mi-1 Mutante von Neurospora Die Cytochromgehalte wurden spektrophotometrisch bestimmt (26). Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp (CAP-gez. Wildtyp) wurde mit 4 g/l Chloramphenicol gezogen. Die Cytochromgehalte der mi-1 Mutante wurden zum Vergleich übernommen aus (26).

Einer eingehenderen Analyse werden die b-Typ Cytochrome in Tab. 3 unterzogen. Die Tabelle zeigt die quantitative Auswertung der Cytochromspektren von Abb. 11. Zur Darstellung der Spektren dienten submitochondriale Partikel

des Wildtyps und submitochondriale Partikel des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit zunehmenden Chloramphenicol-Konzentrationen. Die Partikelpräparation hat gegenüber der Mitochondrienpräparation den Vorteil, daß, wie bereits erwähnt, Cytochrom c aus der Membran herausgelöst wird, welches die Bestimmung der Gehalte der übrigen Cytochrome vereinfacht.

Der Gehalt an b-Typ Cytochromen (angegeben in $\mu\text{Mol/g}$ Protein) ist in Wildtyp Partikeln etwa doppelt so hoch wie in Wildtyp Mitochondrien (vergl. Tab. 1).

Wie in Kap. 3.1.2. erläutert, wurden die Cytochrome einmal mit Dithionit, ein anderes Mal mit Succinat im Antimycin-gehemmten Zustand reduziert.

In gleicher Weise wie in Mitochondrien nimmt in Partikeln der Gehalt an Dithionit-reduzierbarem Cytochrom b_{563} mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen ab. Bei 3 g/l Chloramphenicol ist er auf 1/6 des Anfangsgehaltes herabgesunken (1. Spalte der Tabelle). Von dem nach Dithionit-Reduktion berechneten Gehalt ist immer etwa 60% durch Succinat im Antimycin-gehemmten Zustand reduzierbar (2. Spalte der Tabelle).

Der Gehalt an Cytochrom b_{557} scheint bei diesen Partikelpräparationen nicht abzunehmen, wenn die Spektren der Dithionit-reduzierten Cytochrome zur Auswertung dienen. Aber der durch Succinat im Antimycin-gehemmten Zustand reduzierbare Anteil von Cytochrom b_{557} nimmt parallel zu dem des Cytochrom b_{563} ab (3. und 4. Spalten).

Daraus ergibt sich, daß das Verhältnis der Gehalte der beiden b-Typ Cytochrome sich nicht ändert, wenn der durch Succinat im Antimycin-gehemmten Zustand reduzierbare Anteil zur Berechnung herangezogen wird.

Chloramphenicol im Kulturmedium	Gehalte von		Verhältnis b_{563}/b_{557}	
	Cytochrom b_{563} Reduziert durch Dithionit Succinat	Cytochrom b_{557} Reduziert durch Dithionit Succinat	Dithionit- Succinat- reduziert reduziert	
	(μMol / g Protein)			
g/l				
0	0.63	0.41	0.63	0.38
0.5	0.26	0.16	0.64	0.16
2	0.14	0.09	0.60	0.09
3	0.10	0.06	0.60	0.06
			1.00	1.08
			0.40	1.00
			0.23	1.00
			0.17	1.00

Tab. 3 Aufrechterhaltung der 1:1 Stöchiometrie der Succinat-reduzierbaren Anteile von Cytochrom b_{563} und Cytochrom b_{557} und Anstieg des Gehaltes des Dithionit-reduzierbaren Anteils von Cytochrom b_{557} bei Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese Die Cytochromgehalte wurden an Hand der in Abb. 11 dargestellten Tieftemperatur-Differenzabsorptionsspektren mit Hilfe der Bestimmungsmethode aus (26) berechnet. Als Untersuchungsmaterial dienten submittochondriale Partikel des Wildtyps (0 g/l Chloramphenicol) und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit den entsprechenden Chloramphenicol-Konzentrationen. Weitere Erläuterungen zu dieser Tabelle werden im Text gegeben.

Bei jeder Chloramphenicol-Konzentration bleibt die 1:1 Stöchiometrie von Succinat-reduzierbaren Anteilen von Cytochrom b_{563} / Cytochrom b_{557} aufrechterhalten (letzte Spalte der Tabelle).

Die scheinbare Abweichung von der Äquimolarität besteht, wenn der Gehalt der durch Dithionit reduzierten Cytochrome zur Berechnung verwendet wird (vorletzte Spalte der Tabelle). Diese Werte sind jedoch irreführend. Es tritt offenbar mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen in immer größerem Maße ein drittes b-Typ Cytochrom - nämlich ein nicht durch Succinat reduzierbares Cytochrom b_{557} - auf, welches die gleiche Lichtabsorption aber ein negativeres Redoxpotential besitzt als das unter physiologischen Bedingungen im Wildtyp vorhandene Cytochrom b_{557} . Auf die mögliche Ursache des Auftretens des dritten b-Typ Cytochroms soll in der Diskussion bei der Abhandlung der Proteinsynthese und des Zusammenbaus der Cytochrom b-Untereinheiten eingegangen werden.

3.2. Das Auftreten einer cyanidunempfindlichen Oxidase in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps

In den folgenden Kapiteln werden die unverzweigte Atmungskette des Wildtyps und die verzweigte Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps charakterisiert.

Zum besseren Verständnis soll unter Vorwegnahme einiger Versuchsergebnisse, welche es ermöglichten, den Verlauf des Elektronenflusses in der verzweigten Atmungskette eindeutig festzulegen, an dieser Stelle bereits eine Abbildung gegeben werden, die schematisch den Aufbau der beiden Atmungsketten skizziert (Abb. 12).

In dem Schema sind die Komponenten der unverzweigten Atmungskette (Abb. 12A) in der Reihenfolge angegeben, wie sie an Hand von kinetischen Messungen ihrer Beteiligung am Elektronentransport bestimmt wurde (86). Flavinenzyme (114) und Eisen-Schwefel-Proteine (119) sind nicht eingezeichnet. Die Veränderung der Gehalte der einzelnen Komponenten in der verzweigten Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps (Abb. 12B) ist durch einen Kreis (bei Ubichinon und Cytochrom c) für die Zunahme oder durch eine Klammer (bei Cytochrom b_{557} , b_{563} und a, a_3) für die Abnahme des Gehaltes angedeutet.

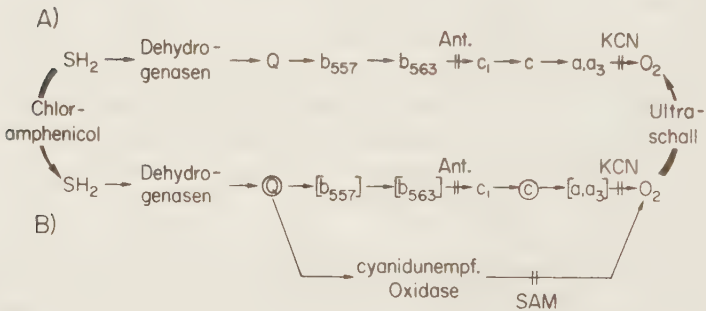


Abb.12 Schema der Atmungsketten des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps A) Wildtyp, unverzweigte Atmungskette. B) Chloramphenicol-gezüchteter Wildtyp, verzweigte Atmungskette. Ubichinon als diffusibler Redoxüberträger (87,88) beliefert wahlweise die Cytochromketten oder die cyanidunempfindliche Oxidase mit Redoxäquivalenten. Die Abkürzungen bedeuten: SH_2 : reduziertes Substrat, Q: Ubichinon, Ant.: Antimycin, SAM: Salicylhydroxamsäure. Weitere Erläuterungen werden im Text gegeben.

Die Verzweigung des Elektronenflusses mit der sich daraus ergebenden Lokalisation der cyanidunempfindlichen Oxidase im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp ist, wie in nachstehenden Kapiteln beschrieben und im Schema dargestellt, im Rahmen dieser Arbeit definiert worden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der Elektronenfluß über die verschiedenen Wege der unverzweigten und der verzweigten Atmungskette durch spezifische Hemmstoffe unterschiedlich hemmbar. Bei Kenntnis des Wirkungsortes eines Hemmstoffes können erste Aussagen über die Beteiligung oder nicht-Beteiligung einzelner Komponenten der Atmungskette am Elektronentransport mit der jeweils gemessenen Atmungsaktivität gemacht werden. Umgekehrt kann die Untersuchung der Elektronenübertragenden Aktivitäten Aufschluß über einen möglicherweise noch nicht bekannten Wirkungsort eines Hemmstoffes geben.

In Abb. 12 sind die bekannten Hemmstellen von KCN, Antimycin und Salicylhydroxamsäure eingezeichnet.

Durch Cyanid wird die Endoxidase Cytochrom a, a_3 blockiert. Die Halbhemmungskonstante (k_i) liegt bei 0.2 mM (89).

Über den Hemmstoff Antimycin ist bekannt, daß er den Elektronenfluß zwischen den b-Typ und den c-Typ Cytochromen unterbricht (83,84,90,91). Antimycin wird mit sehr hoher Affinität (Dissoziationskonstante $K_D = 10^{-11}$ M) gebunden (91,92), eine k_i kann nicht angegeben werden, da es sich um ein stark hydrophobes Molekül handelt.

Salicylhydroxamsäure ist in der unverzweigten Atmungskette, welche Cytochrom a, a_3 als Endoxidase besitzt, unwirksam (17). Bei Organismen jedoch, welche eine cyanidunempfindliche Atmungsaktivität aufweisen, wird diese durch Salicylhydroxamsäure gehemmt. Salicylhydroxamsäure scheint die Reaktion der cyanidunempfindlichen Oxidase mit Sauerstoff zu blockieren (20) Als Halbhemmungskonstante wird für Neurospora eine k_i von 0.2 mM angegeben.

3.2.1. Hemmstoffempfindlichkeit der Atmung intakter Hyphen und isolierter Mitochondrien

Zum Vergleich der mitochondrialen Reaktionen vor und nach der Isolierung der Mitochondrien wurde ein Experiment mit frischen Hyphen (als "in vivo" Versuch) und mit isolierten Mitochondrien (als "in vitro" Versuch) durchgeführt.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Tab. 4 angeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten der Wildtyp und ein Chloramphenicol-gezüchteter Wildtyp, gezogen mit 3 g/l Chloramphenicol. Es wurden die Atmungsaktivitäten mit Succinat als Substrat ohne und nach Zugabe von Hemmstoff gemessen und das Ausmaß der Hemmung berechnet.

Wie in Abb.12A dargestellt, werden beim Wildtyp die Elektronen von einem Substrat wie Succinat oder NADH über die entsprechende Dehydrogenase via Ubichinon und die Cytochromketten zum Sauerstoff transportiert. Der Elektronenfluß kann durch KCN oder Antimycin größtenteils gehemmt werden. Aus Tab. 4 geht hervor, daß dies sowohl für intakte Hyphen als auch für isolierte Mitochondrien zutrifft. Die nur etwa 85%ige Hemmung der Atmung durch KCN oder Antimycin im "in vivo" Versuch ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (40). Es muß berücksichtigt werden, daß in den Hyphen neben der mitochondrialen Atmungskette noch weitere sauerstoffverbrauchende Enzymsysteme, z.B. Komponenten des endoplasmatischen Retikulums, wirksam sind. Das Fehlen des cyanidunempfindlichen Weges in der mitochondrialen Atmungskette des Wildtyps ist daran zu erkennen, daß die Atmungsaktivität durch Salicylhydroxamsäure nicht gehemmt wird.

Im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp dagegen ist die

Atmungsaktivität mit Succinat sowohl in den intakten Hyphen als auch in den Mitochondrien nur zu einem geringen Prozentsatz durch Cyanid oder Antimycin hemmbar. Die Aktivität wird größtenteils durch Salicylhydroxamsäure blockiert. Es wird ein Elektronenfluß gehemmt, welcher nicht die Wirkungsorte von KCN oder Antimycin beinhaltet (vergl. Abb. 12B). Die Aktivitäten, die einmal durch KCN bzw. Antimycin, das andere Mal durch Salicylhydroxamsäure gehemmt werden, sind additiv und ergeben zusammen 100%. Die größere Cyanid- oder Antimycin-hemmbarkeit der Mitochondrien gegenüber den Hyphen kommt durch eine teilweise Inaktivierung der cyanidunempfindlichen Oxidase zustande, die während der Präparation der Mitochondrien nicht zu vermeiden ist. Wie bereits erwähnt, geht bei Ultraschall-Behandlung der Mitochondrien die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität sogar vollständig verloren, während die Aktivität der offensichtlich stabileren Cytochromoxidase erhalten bleibt.

Kultur	Präparation	Hemmung der Atmungsaktivität		
		+KCN	+Ant.	+SAM
		% Hemmung		
Wildtyp	Hyphen	78	85	0
	Mitochondrien	98	88	0
CAP-gez.	Hyphen	8	10	90
Wildtyp	Mitochondrien	30	30	67

Tab.4 Hemmung der Atmungsaktivität von frischen Hyphen und isolierten Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps Die Atmungsaktivität wurde an der Sauerstoffelektrode registriert. Ant.=Antimycin, SAM= Salicylhydroxamsäure.

Die Inaktivierung der cyanidunempfindlichen Oxidase soll mit dem Pfeil rechts neben den Schemata von Abb. 12 angedeutet sein. Nach dem Beschallen der Mitochondrien läßt sich die Atmung des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps nicht mehr von der Atmung des Wildtyps unterscheiden. Der linke Pfeil bedeutet den Übergang von einer unverzweigten in eine verzweigte Atmungskette, d.h. die Ausbildung der cyanidunempfindlichen Oxidase, bei Zugabe von Chloramphenicol zum Kulturmedium des Wildtyps.

3.2.2. Atmungsraten und ihre Hemmstoffempfindlichkeit in Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen

Im vorhergehenden Kapitel wurden für intakte Hyphen und isolierte Mitochondrien analoge Hemmstoffempfindlichkeiten der verschiedenen Atmungsaktivitäten gefunden. Es scheint hiermit die Berechtigung gegeben, die nun im folgenden angegebenen quantitativen Messungen an isolierten Mitochondrien bzw. an submitochondrialen Partikeln durchzuführen.

In Tab. 5 sind die Atmungsaktivitäten von Mitochondrien des Wildtyps und Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen, aufgeführt.

Die Tabelle zeigt, daß mit steigender Chloramphenicol-Konzentration der cyanidunempfindliche Anteil der Atmung (in diesem Experiment gemessen mit NADH als Substrat) immer größer wird. Er umfaßt schließlich 78% der Gesamtaktivität. Cyanidunempfindliche und -empfindliche Atmung

addieren sich stets zu 100%. Die Gesamtaktivität liegt konstant bei ca. 500 $\mu\text{Atom Sauerstoff} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$. Dies bedeutet, daß in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps parallel mit der Abnahme der Aktivität der Cytochromketten kompensatorisch der Weg des Elektronentransports über die cyanidunempfindliche Oxidase ausgebildet wird.

Chloramphenicol im Kulturmedium	Atmungsaktivität		
	-	+KCN	+SAM
g/l	$\mu\text{Atom O} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$		
0	525	0	523
1	500	125	375
2	510	280	220
4	419	327	93

Tab.5 Auftreten einer cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen Der Sauerstoffverbrauch wurde amperometrisch bestimmt. Als Substrat diente 1 mM NADH. Die Hemmstoffzugabe war 2 mM KCN oder 4 mM Sali-
cylhydroxamsäure (SAM).

3.3. Die Verzweigung des Elektronenflusses in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps

In den folgenden Kapiteln wird das experimentelle Vorgehen beschrieben, welches zur Identifizierung der Komponente führte, die die Verzweigung des Elektronenflusses

in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps ermöglicht.

Die Tatsache, daß die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität bei der Veratmung von Succinat oder NADH auch durch Antimycin nicht gehemmt wird (93,26,27), führte schon früh zu der Aussage, daß die Verzweigung in der Atmungskette substratseitig von den c-Typ Cytochromen lokalisiert sein muß (40,31).

Der verminderte Gehalt der b-Typ Cytochrome sowie ihr Redoxverhalten bei ersten Hemmstofftitrationen ließen eine Beteiligung dieser Komponenten an der cyanidunempfindlichen Atmung unwahrscheinlich erscheinen (94,26).

Als bekannte Atmungskettenkomponente, welche die Funktion des Redoxüberträgers zwischen den Dehydrogenasen und der cyanidunempfindlichen Oxidase erfüllen konnte, kam vor allem Ubichinon in Frage.

Das Redoxverhalten des Ubichinons bei Hemmstofftitrationen machte seine Beteiligung an beiden Atmungswegen wahrscheinlich (Kap. 3.3.1.)

Mit dem Beweis, daß sich die verschiedenen Atmungsaktivitäten in Abhängigkeit von dem Ubichinongehalt bei Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation verändern, wurde diese Annahme wesentlich erhärtet (Kap. 3.3.2.).

Zur endgültigen Klärung der noch ausstehenden Fragen diente letztlich das Chinoderivat Durochinon, welches in seiner reduzierten Form (Durohydrochinon) als künstlicher Elektronendonator für die Atmungskette verwendet werden kann. Die diesbezüglichen Experimente sollen in den drei letzten Kapiteln dieses Abschnitts beschrieben werden.

3.3.1. Hemmstofftitrationen der Atmungsaktivität und des Reduktionsgrades von Ubichinon

Die Lokalisation und Funktion einer Atmungskettenkomponente kann u.a. an ihrem Redoxverhalten bei Hemmstofftitrationen näher analysiert werden. Das Redoxverhalten des Ubichinons bei Titrationen mit verschiedenen Hemmstoffen ist an der mi-1 Mutante bereits untersucht worden (26,94).

Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, welcher mit Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 1.5 g/l Chloramphenicol, durchgeführt wurde. Bei dieser Mitochondrienpräparation betrug die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität etwa 40% der Gesamtaktivität.

In den Experimenten wurde die cyanidunempfindliche Oxidase durch Zugabe von steigenden Salicylhydroxamsäure-Konzentrationen titriert. Als Substrat diente Succinat. Die Mitochondrien befanden sich zu Beginn der Titration einmal im ungehemmten Zustand, das andere Mal im Antimycin-gehemmten Zustand. Es wurden simultan die Atmungsaktivität und der Reduktionsgrad des Ubichinons gemessen.

In Abb. 13 sind die Atmungsaktivität bezogen auf die Anfangsaktivität (v/v_0) und der Reduktionsgrad des Ubichinons bezogen auf das aktive, durch Succinat insgesamt reduzierbare Ubichinon (QH_2/Q_{tot}) in Abhängigkeit von der Salicylhydroxamsäure-Konzentration graphisch aufgetragen.

Aus der Abbildung geht hervor, daß in der Abwesenheit von Antimycin, d.h. ohne Hemmung des cyanidempfindlichen Atmungsweges, durch Salicylhydroxamsäure nur 30% der

Atmung gehemmt werden kann. Der Reduktionsgrad des Ubichinons steigt in diesem Zustand von 5% auf 20% an. Bei Hemmung der Cytochromketten durch Antimycin kann die Atmung durch Salicylhydroxamsäure fast vollständig gehemmt werden. Der Reduktionsgrad des Ubichinons beträgt im Antimycin-gehemmten Zustand 25% und steigt im Verlaufe der Salicylhydroxamsäure-Titration auf 92% an.

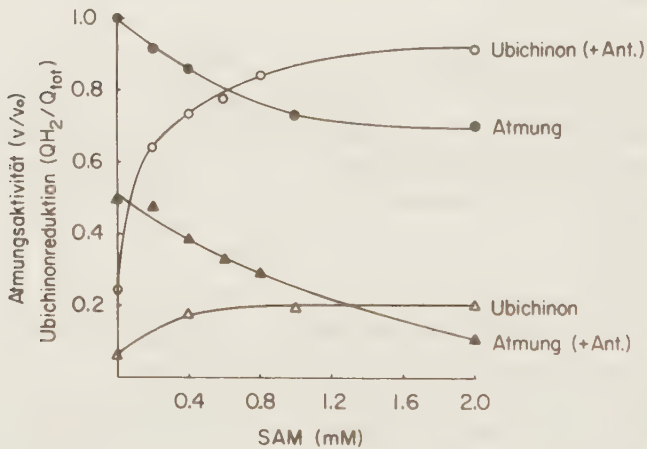


Abb.13 Salicylhydroxamsäure-Titrationsen der Atmungsaktivität und der Ubichinonreduktion in Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps Eine Titration (+Ant.) wurde in Gegenwart von 1 μM Antimycin durchgeführt. Die Atmung wurde an der Sauerstoffelektrode, die Ubichinonreduktion durch Extraktion und Messung von Aliquots bestimmt. Jeder Punkt der Kurve wurde durch ein einzelnes Experiment erhalten. Als Substrat diente 5 mM Succinat. Die Atmungsaktivität betrug ohne Zusatz von Hemmstoffen 270 $\mu\text{Atom Sauerstoff} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$. Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 1.5 g/l Chloramphenicol gezogen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Ubichinonreduktion spiegelbildlich zur Hemmung der Atmung sowohl bei Aktivität beider Wege des Elektronentransports in der verzweigten Atmungskette als auch bei alleiniger Aktivität des cyanidunempfindlichen Atmungsweges verläuft. Dieses Redoxverhalten deutet darauf hin, daß Ubichinon an beiden Wegen in der verzweigten Atmungskette funktionell beteiligt ist.

In einem weiteren Experiment wurde der Reduktionsgrad des Ubichinons in verschiedenen, definierten Zuständen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 graphisch dargestellt. Als Untersuchungsmaterial dienten Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 2 g/l Chloramphenicol. Bei dieser Mitochondrienpräparation war die Atmungsaktivität zu etwa 50% cyanidunempfindlich. Als Substrat wurde Succinat verwendet.

Im aeroben Zustand ohne weitere Zugaben, d.h. bei ungehemmter Atmungsaktivität, ist Ubichinon zu 20% reduziert. Bei Hemmung eines der beiden Wege des Elektronentransports in der verzweigten Atmungskette steigt die Ubichinonreduktion jeweils auf etwa 50% an: im KCN-gehemmten Zustand ist der Reduktionsgrad von Ubichinon geringfügig niedriger, bei Hemmung der cyanidunempfindlichen Oxidase durch Salicylhydroxamsäure beträgt er genau 50%. In Gegenwart von KCN und Salicylhydroxamsäure zugleich werden beide Atmungsaktivitäten blockiert. Der Reduktionsgrad von Ubichinon beträgt dann ca. 70%. Dieser Wert entspricht der Ubichinonreduktion in Mitochondrien, bei denen nach Zugabe von Succinat die Atmung bis zum Erreichen des anaeroben Zustandes ($O_2=0$) abgelaufen war.

Auch diese Ergebnisse besagen, daß sich Ubichinon entsprechend dem Schema der Atmungskette des Chloramphenicol-

gezüchteten Wildtyps, wie in Abb. 12B dargestellt, als Komponente beider Wege des Elektronentransports in der verzweigten Atmungskette verhält.

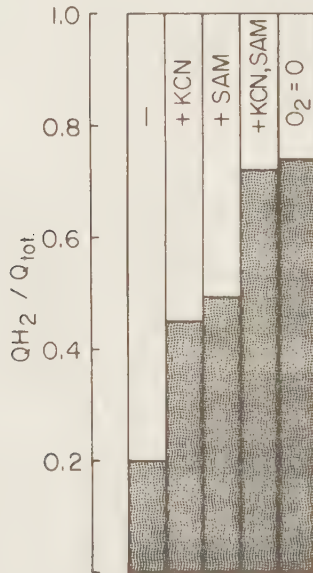


Abb.14 Der Reduktionsgrad des Ubichinons in Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps bei Hemmung der Atmung durch KCN oder Salicylhydroxamsäure Das Experiment wurde zur Kontrolle der Atmungsaktivität an der Sauerstoffelektrode durchgeführt. Die Ubichinonreduktion wurde durch Extraktion und Messung von Aliquots bestimmt. Als Substrat diente 5 mM Succinat. Die Hemmstoffe - 2 mM KCN, 4 mM Salicylhydroxamsäure (SAM) - wurden vor Zugabe des Substrates 2 Min. mit der Mitochondriensuspension vorinkubiert. Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 2 g/l Chloramphenicol gezogen.

3.3.2. Die Atmungsaktivitäten in Abhängigkeit von dem Ubichinongehalt bei Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation

In Tab. 6 sind die Ergebnisse von Ubichinon-Extraktions- und -Reinkorporationsexperimenten, welche nach der Methode von Ernster et al. (73) durchgeführt wurden, zusammengestellt. Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten Mitochondrien des Wildtyps und eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 4 g/l Chloramphenicol.

Wie ausführlich in der Methodik erklärt, wurde aus den Mitochondrien im gefriergetrockneten Zustand das konstitutive Ubichinon mit wasserfreiem Pentan extrahiert. Anschließend kann Ubichinon-9, in Pentan gelöst, wieder reinkorporiert werden. Von den einzelnen Präparationsstufen wurden die Atmungsaktivitäten mit NADH als Substrat sowie ihre Hemmstoffempfindlichkeit gemessen.

Im Wildtyp wird die NADH-Atmung durch Ubichinon-Extraktion zu 94% gehemmt. Nach Reinkorporation von Ubichinon-9 kann die Atmung zu 92% reaktiviert werden. Wie zu erwarten, ist diese Atmung in jeder Präparation durch KCN voll hemmbar, Salicylhydroxamsäure hingegen ist unwirksam. Gleiche Ergebnisse (nicht aufgeführt) wurden mit Succinat als Substrat erhalten. Diese Experimente zeigen, daß Ubichinon in gleicher Weise wie in der Atmungskette von Säugetiermitochondrien (95) eine essentielle Komponente der unverzweigten Atmungskette von Neurospora Wildtyp ist.

Die Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps zeigen vor der Ubichinon-Extraktion eine Atmungsaktivität, die zu 80% cyanidunempfindlich und zu 20% durch KCN hemmbar ist. Nach Ubichinon-Extraktion geht

die Aktivität beider Wege des Elektronentransports in der verzweigten Atmungskette fast vollständig verloren. Nach Reinkorporation von Ubichinon-9 gelingt es, 46% der Gesamtaktivität zu reaktivieren. Davon sind 65% cyanidunempfindlich und 35% der Aktivität durch KCN hemmbar. Dieses Experiment zeigt deutlich, daß Ubichinon eine gemeinsame Komponente sowohl des cyanidhemmbaren als auch des cyanidunempfindlichen Weges in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps ist.

Mitochondrien- Präparation	Atmungsaktivität			
	-	+KCN	+SAM	+KCN+SAM
	$\mu\text{Atom O.Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$			
<u>Wildtyp</u>				
unbehandelt	525	0	520	-
extrahiert	33	0	30	-
reinkorporiert	485	0	470	-
<u>CAP-gez. Wildtyp</u>				
unbehandelt	492	366	102	5
extrahiert	24	0	25	0
reinkorporiert	227	147	80	20

Tab.6 Inaktivierung und Reaktivierung der Atmung durch Ubichinon-Extraktion und -Reinkorporation in Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps Ubichinon wurde aus den Mitochondrien extrahiert und reinkorporiert nach Ernster et al. (73). Zur Reinkorporation diente Ubichinon-9. Die Atmungsaktivitäten wurden an der Sauerstoffelektrode gemessen. Als Substrat diente 1 mM NADH. Wenn angegeben erfolgte die Zugabe von 2 mM KCN, 4 mM Salicylhydroxamsäure (SAM) oder beiden Hemmstoffen. Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 4 g/l Chloramphenicol gezogen.

Die Ergebnisse der Ubichinon-Extraktions- und -Reinkorporationsexperimente erlauben jedoch noch nicht die Entscheidung, ob Ubichinon lediglich vor der Verzweigung im gemeinsamen Abschnitt beider Atmungswege des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps liegt, oder ob es genau die Komponente ist, welche unmittelbar beide Zweige der Atmungskette mit Elektronen versorgt. Die Klärung dieser Frage soll in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

3.3.3. Der Redoxzustand der b- und c-Typ Cytochrome bei Hemmung der Atmungskette durch KCN oder Antimycin

Bei der Untersuchung des Redoxverhaltens einer Atmungskettenkomponente kann als Elektronendonator ein natürliches Substrat, wie etwa NADH oder Succinat (s. Kap. 3.3.1.), oder ein künstlicher Redoxmediator, wie z.B. Durochinon (Tetramethyl-p-benzochinon) in der reduzierten Form (Durohydrochinon) verwendet werden. Dies kann eine Erweiterung der üblichen Titrationsexperimente bedeuten, wenn die Eintrittsstelle der Elektronen bei der Reduktion durch den künstlichen Mediator eine andere ist, als die der natürlichen Substrate.

Die Untersuchungen von Ruzicka et al. (96,97) an Rinderherzmitochondrien und von Boveris et al. (98,99) an Taubenherzmitochondrien haben ergeben, daß Durohydrochinon in der Atmungskette von höheren tierischen Organismen veratmet wird. Ruzicka et al. konnten zeigen, daß die mit Durohydrochinon gemessene Atmungsaktivität KCN- und Antimycinhemmbar und unabhängig von dem Gehalt an konstitutivem Ubichinon ist. Boveris et al. schlossen aus ihren kinetischen Studien, daß Durohydrochinon spezifisch mit den b-Typ Cytochromen reagiert.

Im folgenden wird die Reaktion von Durohydrochinon mit Atmungskettenkomponenten von *Neurospora* untersucht.

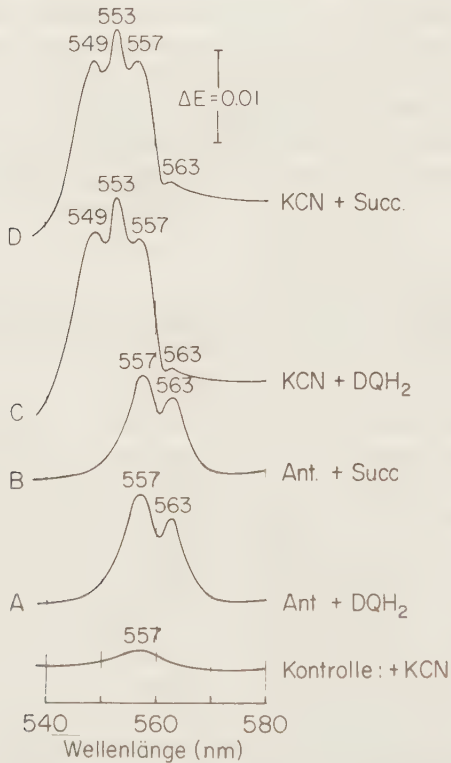


Abb.15 Tieftemperatur-Differenzabsorptionsspektren der Cytochrome von submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps im KCN- und im Antimycin-gehemmten Zustand Zur Darstellung der Spektren erfolgte in der Meßseite wie angegeben der Zusatz von 5 mM Succinat oder 0.1 mM Durohydrochinon (DQH₂) und 1 mM KCN oder 2 μ M Antimycin. Die Vergleichsseite war im aeroben Zustand, ohne Zugaben. Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 0.5 g/l Chloramphenicol gezogen.

Abb. 15 zeigt die Tieftemperatur-Cytochromspektren von submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, dargestellt im Antimycin- und im KCN-gehemmten Zustand nach Reduktion mit Succinat oder mit Durohydrochinon. Vergleichbare Ergebnisse werden mit Partikeln des Wildtyps erhalten. Die Spektren der durch Succinat reduzierten Cytochrome (Spektren B und D) sollen hier lediglich als Vergleichsspektren dienen. Man erkennt, daß die Spektren der durch Durohydrochinon reduzierten Cytochrome in den entsprechenden Zuständen sich im Wesentlichen nicht von denen der durch Succinat reduzierten Cytochrome unterscheiden.

Im Antimycin-gehemmten Zustand mit Durohydrochinon als Elektronendonator (Spektrum A) sind die zwei Banden der beiden b-Typ Cytochrome mit ihren Maxima bei 563 nm und 557 nm deutlich sichtbar. Im KCN-gehemmten Zustand mit Durohydrochinon als Elektronendonator (Spektrum C) ist Cytochrom b_{557} größtenteils reduziert, die Bande von Cytochrom b_{563} ist kaum sichtbar. Das Maximum bei 553 nm und die Schulter bei 549 nm gehören zu Cytochrom c_1 , welches in diesem Zustand reduziert wird. Da es sich um Spektren von Partikelpräparationen handelt, bei denen, wie bereits erwähnt, das Cytochrom c herausgelöst wird, fehlt die Bande dieses Cytochroms.

Die Höhen der Banden in den Spektren der Durohydrochinon-reduzierten Cytochrome stimmen mit denen der entsprechenden Spektren der Succinat-reduzierten Cytochrome ebenfalls überein. Mit Durohydrochinon als Elektronendonator sind also die b- und c-Typ Cytochrome sowohl im Antimycin- als auch im KCN-gehemmten Zustand jeweils im gleichen Ausmaße wie mit Succinat als Substrat reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, daß Durohydrochinon auch in Neurospora als Elektronendonator dienen kann und daß offenbar der

Elektronentransport wie bei der Verwendung von Succinat in der unverzweigten Atmungskette von submitochondrialen Partikeln durch Antimycin gehemmt wird. Über die Eintrittsstelle der Elektronen von Durohydrochinon in die Atmungskette erlaubt dieser Versuch noch keine Aussage.

Zur Kontrolle wurde mit KCN bzw. mit Antimycin (nicht gezeigt) aber ohne Substratzugabe ein Spektrum dargestellt. Es gibt nur eine geringfügige Reduktion von Cytochrom b_{557} an. Dies bedeutet, daß die in den Spektren A-D registrierten Reduktionszustände tatsächlich substratabhängig sind und nicht etwa auf eine unspezifische Reduktion durch Endosubstratreste zurückzuführen sind.

Die quantitative Auswertung der Spektren soll in Kap.

3.3.5. zusammenfassend mit weiteren dort angeführten Ergebnissen diskutiert werden.

3.3.4. Unterschiedliche Hemmung der NADH- und der Durohydrochinon-Oxidation durch Antimycin

Die Oxidation von Durohydrochinon über die unverzweigte und die verzweigte Atmungskette wurde an Mitochondrien des Wildtyps und eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 4 g/l Chloramphenicol untersucht.

In Tab. 7 sind die Atmungsaktivitäten mit NADH und Durohydrochinon oben und nach Zugabe der Hemmstoffe KCN, Antimycin und Salicylhydroxamsäure angegeben. Die Verwendung von NADH anstelle von Succinat als Substrat für die Messung der Atmungsaktivitäten hat den Vorteil, daß eine etwaige Inaktivierung der ATP-abhängigen Succinatdehydrogenase umgangen wird.

Im Wildtyp wird Durohydrochinon mit einer ebenso hohen

Aktivität wie NADH oxidiert. Die Atmung ist beidemale voll KCN- und Antimycinhemmbar und Salicylhydroxamsäure zeigt erwartungsgemäß keine Hemmwirkung.

Im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp ist die Aktivität der Durohydrochinon-Oxidation zwar niedriger als die der NADH-Atmung, aber sowohl mit Durohydrochinon als auch mit NADH sind die Aktivitäten nur zu 20% cyanidhemmbar und werden zu ca. 80% durch Salicylhydroxamsäure gehemmt. Die Wirkung beider Hemmstoffe addiert sich zu 100%. Dieses Ergebnis zeigt an, daß in den Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps Durohydrochinon in gleicher Weise wie NADH über beide Wege der verzweigten Atmungskette oxidiert wird, wobei der überwiegende Teil des Elektronenflusses im nicht-gehemmten Zustand über die cyanidunempfindliche Oxidase erfolgen dürfte.

Bei der Untersuchung der Antimycin-Wirkung stellt es sich heraus, daß im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp die Oxidation von Durohydrochinon und NADH in sehr unterschiedlicher Weise gehemmt wird.

Wie die Tabelle zeigt, wird beim Wildtyp sowohl die NADH- als auch die Durohydrochinon-Oxidation von Antimycin in gleichem Maße wie von KCN voll gehemmt.

Beim Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp wird die NADH-Atmung nur zu 20% wie von KCN gehemmt. 80% des Elektronenflusses erfolgt in beiden Hemmzuständen über die cyanidunempfindliche Oxidase. Die Durohydrochinon-Oxidation jedoch, von KCN ebenfalls nur zu 20% gehemmt, wird von Antimycin voll blockiert. Dies bedeutet, daß die Redox-äquivalente von Durohydrochinon im Antimycin-gehemmten Zustand nicht über den cyanidunempfindlichen Weg der verzweigten Atmungskette fließen können, während die NADH- oder Succinat-Atmung in diesem Zustand möglich ist.

Mitochondrien- Präparation	Atmungsaktivität							
	NADH				DQH ₂			
	-	+KCN	+Ant.	+SAM	-	+KCN	+Ant.	+SAM
	$\mu\text{Atom Sauerstoff} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$							
Wildtyp	525	0	0	523	525	0	0	520
CAP-gez. Wildtyp	579	455	455	104	329	266	0	65

Tab.7 Unterschiedliche Hemmung der Durohydrochinon- und der NADH-Atmung durch Antimycin in Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps Die Atmungsaktivität wurde an der Sauerstoffelektrode mit 0.5 mM Durohydrochinon (DQH₂) oder 1 mM NADH als Substrat gemessen. Die Hemmstoffzugaben waren 1 mM KCN, 2 μM Antimycin oder 4 mM Salicylhydroxamsäure (SAM). Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 3 g/l Chloramphenicol gezogen.

Zum besseren Verständnis sollen die Versuchsergebnisse an Hand von Abb. 12 und 16 erläutert werden.

Die Redoxäquivalente von NADH oder Succinat gelangen über die Dehydrogenasen zum Ubichinon (88). Im Wildtyp (Abb. 12A) können die Elektronen nur über die Cytochrome zum Sauerstoff gelangen. Dieser Weg wird durch KCN oder Antimycin gehemmt. Das gleiche trifft für die Durohydrochinon-Oxidation im Wildtyp zu.

Im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp (Abb. 12B) können die Elektronen von NADH oder Succinat im KCN- oder Antimycin-gehemmten Zustand über den cyanidunempfindlichen Weg zum Sauerstoff gelangen. Die Hemmung wird durch die Verzweigung der Atmungskette umgangen. Bei der Oxidation von Durohydrochinon können die Elektronen über den cyanidunempfindlichen

Weg zum Sauerstoff fließen, wenn die Atmung ungehemmt oder durch KCN gehemmt ist. Nach Zugabe von Antimycin ist die Durohydrochinon-Oxidation jedoch voll gehemmt. An Hand der Cytochromspektren von Abb. 15 (Kap. 3.3.2.) wurde gezeigt, daß im Antimycin-gehemmten Zustand mit Durohydrochinon wie mit Succinat beide b-Typ Cytochrome reduziert sind.

Durch die Atmungsexperimente wird die von Bonner et al. (16) aufgestellte Theorie eines mit Antimycin zum größten Teil reduzierten aber autoxidablen Cytochrom b widerlegt. Ebenso schließen die Experimente aus, daß ein b-Typ Cytochrom direkt an der Verzweigung des Elektronenflusses in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps beteiligt sein könnte.

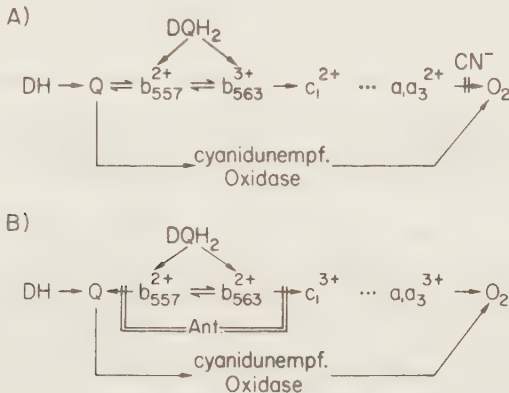


Abb.16 Schema des Elektronentransports in der Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps im KCN- und im Antimycin-gehemmten Zustand
A) KCN-gehemmter Zustand. B) Antimycin-gehemmter Zustand. Die Abkürzungen bedeuten: DH: Dehydrogenase, Q: Ubichinon, DQH₂: Durohydrochinon und Ant.: Antimycin.

In Abb. 16 wird festgelegt, daß auch in *Neurospora*, wie bei höheren tierischen Organismen, Durohydrochinon direkt mit den b-Typ Cytochromen reagiert. In der Abbildung ist die verzweigte Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps in zwei verschiedenen Zuständen schematisch dargestellt.

Im KCN-gehemmten Zustand fließen die Elektronen von Durohydrochinon über die b-Typ Cytochrome zum Ubichinon und von dieser Komponente über die cyanidunempfindliche Oxidase zum Sauerstoff (Abb. 16A). Im Antimycin-gehemmten Zustand dagegen wird dieser Elektronenfluß blockiert, weil der Elektronenaustausch zwischen den b-Typ Cytochromen und Ubichinon (er stellt in dieser Richtung in der unverzweigten Atmungskette eine "Rückreaktion" dar, welche bei Atmungsexperimenten mit den üblichen Substraten nicht erfaßt wird) durch Antimycin gehemmt wird (Abb. 16B).

3.3.5. Der Redoxzustand von Ubichinon bei Hemmung der Atmungskette durch KCN oder Antimycin

Die Frage, ob das konstitutive Ubichinon von Durohydrochinon reduziert werden kann, wurde von Boveris et al. (98,99) und von Kröger et al. (100,101) untersucht. Sie gelangten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Beide Arbeitsgruppen führten optische Direktmessungen der Ubichinonreduktion durch, welche jedoch mit Schwierigkeiten verbunden sind. Bei der Messung treten Interferenzen verschiedener Absorptionssignale auf.

Boveris et al. fanden, daß Ubichinon durch Durohydrochinon in Gegenwart von KCN reduziert wird und daß diese Reaktion in Gegenwart von Antimycin verlangsamt ist. Sie registrierten bei dem Wellenlängenpaar 285-305 nm, zwei

isosbestischen Punkten von Durochinon in ihrem System. Es waren also keine Redoxveränderungen des Elektronendonors zu berücksichtigen, wohl aber ein Absorptionssprung bei jeder Zugabe von Durohydrochinon. Außerdem treten Interferenzen der $\bar{O}$ -Bande des Cytochrom c bei der Messung auf.

Kröger et al. berichten, daß Ubichinon weder in Gegenwart von KCN noch von Antimycin durch Durohydrochinon reduziert wird. Ihre Messungen wurden bei dem Wellenlängenpaar 280-289 nm durchgeführt, d.h. Cytochrom c interferierte nicht, aber es konnten nur sehr geringe Mengen an Durohydrochinon zugegeben werden, da die Oxidation des Elektronendonors bei der Messung der Ubichinonreduktion interferierte.

Eine interferenzfreie Messung der Redoxveränderung von Ubichinon in Gegenwart von hohen Durohydrochinon-Konzentrationen gelingt, wenn die Bestimmung des Redoxzustandes von Ubichinon nach dessen Extraktion aus der Präparation durchgeführt wird. Die Methodik hierfür wurde in allen Einzelheiten ausgearbeitet und ist in Kap. 2.6.3. ausführlich beschrieben.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, welcher mit submitochondrialen Partikeln eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 0.5 g/l Chloramphenicol, durchgeführt wurde. Es wurde speziell dieses Material zur Untersuchung verwendet, da i) im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp eine Veränderung auch des Gehaltes von Ubichinon auftritt. Wie von Jagow et al. (34) berichten, steigt der Gehalt an konstitutivem Ubichinon bis auf das zehnfache an. Ubichinonbestimmungen, wie etwa die Messung des Redoxzustandes dieser Komponente, sind im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp dementsprechend einfacher; ii) infolge der Ultraschallbehandlung wird

c. cyanidunempfindliche Atmung nahezu vollständig inaktiviert, was die Untersuchung des Elektronenaustausches zwischen den b-Typ Cytochromen und Ubichinon auch wieder vereinfacht. Wie graphisch dargestellt, wurde der Reduktionsgrad des Ubichinons in Abhängigkeit von der Durohydrochinon-Konzentration bestimmt. Dabei befanden sich die Partikelpräparationen, aus denen das Ubichinon extrahiert wurde, einmal im KCN-gehemmten Zustand und ein anderes Mal im Antimycin-gehemmten Zustand.

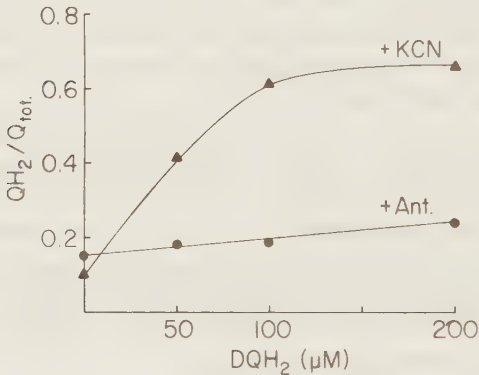


Abb.17 Der Redoxzustand des konstitutiven Ubichinons im KCN- und im Antimycin-gehemmten Zustand mit Durohydrochinon als Elektronendonator Das Experiment wurde durchgeführt mit submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 0.5 g/l Chloramphenicol. Nach Zugabe des Hemmstoffes (1 mM KCN oder 2 μM Antimycin) sowie der entsprechenden Durohydrochinon(DQH_2)-Konzentration wurde 1 Min. bei 25°C inkubiert. Danach wurde der Reduktionsgrad des Ubichinons wie in Kap. 2.6.3. beschrieben durch Extraktion und Messung von Aliquots bestimmt.

Im KCN-gehemmten Zustand ohne Durohydrochinon ist Ubichinon durch Endosubstratreste der Präparation bereits zu 10% reduziert. Die Zugabe von Durohydrochinon bewirkt einen Anstieg des Reduktionsgrades. Die maximale Ubichinonreduktion beträgt etwa 60% und wird mit 100 μ M Durohydrochinon erreicht. Die relativ hohe Konzentration an Durohydrochinon, welche zur Erlangung des maximalen Effekts notwendig ist, dürfte auf einer unvollständigen Inaktivierung der cyanidunempfindlichen Oxidase beruhen. Ein geringfügiger Elektronenfluß über diese Oxidase kann nicht ganz ausgeschlossen werden.

Im Antimycin-gehemmten Zustand ist ohne Durohydrochinon das Ubichinon zu etwa 15% reduziert, die Zugabe von Durohydrochinon läßt den Reduktionsgrad jedoch kaum um 5% ansteigen.

Die Ergebnisse zeigen, daß das konstitutive Ubichinon durch Durohydrochinon in Gegenwart von KCN reduziert werden kann, und daß die Ubichinonreduktion durch Durohydrochinon in Gegenwart von Antimycin blockiert ist.

In Tab. 8 sind die quantitativen Daten zu den in Kap. 3.3.3. beschriebenen Cytochromspektren und die Ergebnisse der Ubichinonbestimmungen zusammengestellt.

Im KCN-gehemmten Zustand sind sowohl mit Durohydrochinon als auch mit Succinat Ubichinon und Cytochrom b_{557} größtenteils reduziert, Cytochrom b_{563} größtenteils oxidiert. Im Antimycin-gehemmten Zustand sind mit Durohydrochinon oder mit Succinat beide b-Typ Cytochrome größtenteils reduziert. Der Reduktionszustand von Ubichinon ist im Gegensatz dazu jedoch abhängig von der Art des verwendeten Elektronendonors. Mit Durohydrochinon im Antimycin-gehemmten Zustand verbleibt Ubichinon vollständig oxidiert, während es durch Succinat vollständig reduziert wird.

Zustand	Zugaben		Reduktionsgrad von		
	Hemmstoff	Substrat	Q	b ₅₅₇	b ₅₆₃
			% Reduktion		
KCN- gehemmt	KCN	Succinat	75	80	7
	"	Durohydro- chinon	65	70	3
Antimycin- gehemmt	Ant.	Succinat	75	70	80
	"	Durohydro- chinon	10	65	78
Kontrolle	KCN	---	10	7	0

Tab.8 Der Redoxzustand des Ubichinons und der b-Typ Cytochrome in submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps im KCN- und im Antimycin-gehemmten Zustand Die Hemmstoff- und Substratzugabe erfolgte wie in der Legende zu Abb. 15 beschrieben. Die in dieser Abbildung dargestellten Spektren dienten zur Berechnung des Reduktionsgrades der b-Typ Cytochrome. Der Reduktionsgrad des Ubichinons wurde in Parallelexperimenten durch Extraktion von Aliquots gemessen. Q: Ubichinon, Ant.: Antimycin.

Die Schemata in Abb. 16 unterscheiden die zwei funktionellen Zustände: im KCN-gehemmten Zustand (Abb. 16A) ist Cytochrom b₅₅₇ mit Durohydrochinon in gleichem Ausmaße reduziert wie mit Succinat. Der Elektronenfluß verläuft entweder über Cytochrom b oder die Succinatdehydrogenase zum Ubichinon und über den cyanidunempfindlichen Weg der verzweigten Atmungskette zum Sauerstoff. Im Antimycin-

gehemmten Zustand (Abb. 16B) sind beide b-Typ Cytochrome reduziert, mit Durohydrochinon ebenso wie mit Succinat. Aber der Elektronentransport von den b-Typ Cytochromen zum Ubichinon ist gehemmt. Deshalb können die Redox-äquivalente von Durohydrochinon nicht über die cyanidunempfindliche Oxidase zum Sauerstoff gelangen. Cytochrom c_1 befindet sich, wie lange bekannt (83,84) unter diesen Umständen im oxidierten Zustand, d.h. der Elektronenaustausch zwischen den b-Typ und den c-Typ Cytochromen ist ebenfalls gehemmt. Mit Succinat oder NADH, welche von einer Dehydrogenase oxidiert werden, verläuft der Elektronenfluß unbeeinflußt von dem Antimycinblock nach wie vor über Ubichinon und die cyanidunempfindliche Oxidase zum Sauerstoff.

3.4. Die Antimycin-Wirkung auf die Elektronen- übertragende Aktivität der b-Typ Cytochrome

Die Antimycin-Wirkung war bisher auf die Hemmung des Elektronenflusses zwischen den b- und den c-Typ Cytochromen beschränkt worden (83,84,90,91).

An Hand der verzweigten Atmungskette des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps von Neurospora wurde bei Atmungsexperimenten (Kap. 3.3.4.) erstmals eine unterschiedliche Antimycin-Wirkung bei NADH- und Durohydrochinon-Oxidation gefunden. Dieser Unterschied deutete die Existenz eines bisher nicht untersuchten Wirkungsortes von Antimycin an.

Mit dem Beweis, daß Durohydrochinon direkt mit den b-Typ Cytochromen reagiert (Kap. 3.3.3.) und der eindeutigen Bestimmung des Redoxzustandes von Ubichinon in verschiedenen Zuständen (Kap. 3.3.5.) kann eine Hemmung des Elektronenübergangs von den Ferrocycyochromen b_{557} und b_{563}

zum Ubichinon als erwiesen gelten. Diese qualitative Aussage wird durch quantitative Messungen, d.h. der im folgenden Kapitel beschriebenen Antimycintitration der Durohydrochinon-Oxidation erhärtet.

Eine zusätzliche Wirkung des Antimycins, nämlich die Hemmung der Durochinon-Reduktion bei der Verwendung von Succinat als Wasserstoffdonor im KCN-gehemmten Zustand soll ebenfalls durch eine Antimycintitration analysiert werden (Kap. 3.4.2.).

Die dabei registrierte Zunahme des Reduktionsgrades von Cytochrom b_{563} kann bei sämtlichen Antimycintitrationen beobachtet werden und soll getrennt in Kap. 3.4.3. abgehandelt werden.

3.4.1. Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation durch Antimycin

Die Durohydrochinon-Oxidation kann wie in Kap. 3.3.4. beschrieben in Atmungsexperimenten an der Sauerstoffelektrode oder auch durch empfindlichere optische Messungen am Doppelstrahl-Spektrophotometer registriert werden. Die Direktmessung ist in diesem Falle möglich, da Durohydrochinon in großem Überschuß zugegeben werden kann, also keine Interferenzen von Ubichinon oder Cytochrom c zu befürchten sind.

Bei Titrationsexperimenten wird durch Direktmessung der Absorptionszunahme bei 270-284 nm die Oxidationsrate ohne Hemmstoff ($v_{DQH_2}^{max}$) und nach Zugabe von steigenden Konzentrationen des Hemmstoffes (v_{DQH_2}) bestimmt.

In Abb. 18 ist das Ergebnis eines Antimycin-Titrations-

experiments dargestellt. Als Untersuchungsmaterial dienten Mitochondrien eines Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps, gezogen mit 1 g/l Chloramphenicol. Bei dieser niedrigen Chloramphenicolkonzentration ist der cyanid-hemmbarer Anteil noch relativ hoch, d.h. im KCN-gehemmten Zustand kann die Messung der Durohydrochinon-Oxidationsrate über den cyanidunempfindlichen Weg sehr exakt durchgeführt werden. Graphisch aufgetragen ist jeweils die relative Durohydrochinon-Oxidationsrate ($v_{DQH_2}/v_{DQH_2}^{max}$) gegen die Antimycinkonzentration.

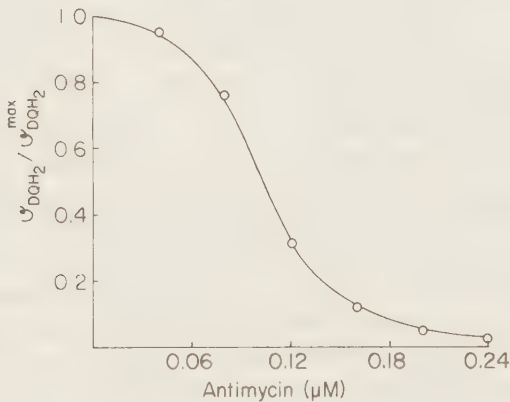


Abb.18 Antimycintitration der Durohydrochinon-Oxidation über den cyanidunempfindlichen Atmungsweg in Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps
Die Durohydrochinon(DQH_2)-Oxidationsrate wurde mit 0.1 mM Durohydrochinon als Elektronendonator in Gegenwart von 1 mM KCN bei 270-284 nm bestimmt. Der Chloramphenicol-gezüchtete Wildtyp wurde mit 1 g/l Chloramphenicol gezogen. Die Proteinkonzentration im Ansatz war 0.75 mg Protein/ml. Die Ausgangsaktivität der Durohydrochinon-Oxidation ($v_{DQH_2}^{max}$) betrug $100 \mu Mol.Min^{-1}.(g Protein)^{-1}$.

Die Abbildung zeigt, daß bei einer Antimycinkonzentration von etwa $0.14 \mu\text{M}$ die volle Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation erreicht wird. Diese Antimycinkonzentration stimmt bezeichnenderweise überein mit dem Gehalt an einem der beiden b-Typ Cytochrome - die zwei b-Typ Cytochrome sind, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (vergl. Abs. 3.1.) immer in äquimolaren Konzentrationen vorhanden. Die Cytochromgehalte wurden spektrophotometrisch bestimmt.

Der Titer für volle Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation beträgt demzufolge 1:1:1 für Antimycin/Cytochrom b_{563} /Cytochrom b_{557} . Auf den nicht-linearen Verlauf der Titrationskurve soll zusammen mit der Besprechung weiterer nicht-linearer Antimycin-Titrationskurven, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden, in der Diskussion eingegangen werden.

3.4.2. Hemmung der Durochinon-Reduktion durch Antimycin

Die Untersuchungen von Ruzicka et al. (96,97) haben ergeben, daß Durochinon in der oxidierten Form als Elektronenakzeptor für Redoxäquivalente, die über die Atmungskette von NADH geliefert werden, dienen kann. Sie berichten, daß die Extraktion des konstitutiven Ubichinons aus submitochondrialen Partikeln von Rinderherz die Reduktion durch NADH inaktiviert und daß eine Reaktivierung durch die Reinkorporation von Ubichinon-10 möglich ist.

Boveris et al. (98,99) bestimmten in Taubenherzmitochondrien mit Succinat im KCN-gehemmten Zustand eine Durochinon-Reduktionsrate von $10-15 \mu\text{Mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$ und sie berichten, daß diese Aktivität durch Antimycin gehemmt werden kann. Im folgenden soll diese Reaktion mit *Neurospora* näher analysiert werden.

Die Durochinon-Reduktion durch Succinat im KCN-gehemmten Zustand kann in ähnlicher Weise wie die Durohydrochinon-Oxidation durch Direktmessungen bestimmt werden. Es wird die Absorptionsabnahme bei 270-284 nm nach Zugabe des Substrats registriert.

In submitochondrialen Partikeln von *Neurospora* beträgt die Durochinon-Reduktionsrate $20-50 \mu\text{Mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot (\text{g Protein})^{-1}$ und die Aktivität läßt sich mit Antimycin titrieren.

Bei Titrationsexperimenten wird die Reduktionsrate ohne Hemmstoff ($v_{\text{DQ}}^{\text{max}}$) und nach Zugabe von steigenden Konzentrationen des Hemmstoffes (v_{DQ}) bestimmt.

In Abb. 19 ist das Ergebnis einer Antimycintitration der Durochinon-Reduktion durch Succinat dargestellt. Als Untersuchungsmaterial dienten submitochondriale Partikel des Wildtyps im KCN-gehemmten Zustand. Ähnliche Ergebnisse wurden mit submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps erhalten. Die Partikelpräparationen sind für optische Messungen im UV-Bereich besser geeignet als Mitochondrienpräparationen, da weniger Interferenzen auftreten. Graphisch aufgetragen ist jeweils die relative Durochinon-Reduktionsrate ($v_{\text{DQ}}/v_{\text{DQ}}^{\text{max}}$) gegen die Antimycinkonzentration. Dabei ist die Antimycinkonzentration hier auf den Gehalt an Cytochrom b_{563} in der Probe bezogen, d.h. sie ist angegeben als molares Verhältnis von Antimycin zu Cytochrom b_{563} . Der Cytochromgehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Die Abbildung zeigt, daß die nahezu volle Hemmung der Durochinon-Reduktion erreicht wird, wenn das auf der Abszisse aufgetragene molare Verhältnis von Antimycin zu Cytochrom b_{563} den Wert 1 hat. In Anbetracht der äquimolaren Stöchiometrie der beiden b-Typ Cytochrome beträgt demnach auch für diese Reaktion der Titer für volle Hemmung 1:1:1

für Antimycin/Cytochrom b_{563} /Cytochrom b_{557} .

Die Ergebnisse deuten an, daß bei der Durochinon-Reduktion durch Succinat im KCN-gehemmten Zustand der Elektronenübergang von den Ferrocytochromen b_{557} und b_{563} zum Durochinon durch Antimycin gehemmt wird. Zur endgültigen Bestätigung dieser Annahme wurde der Redoxzustand der b-Typ Cytochrome unter diesen Bedingungen nochmals über-

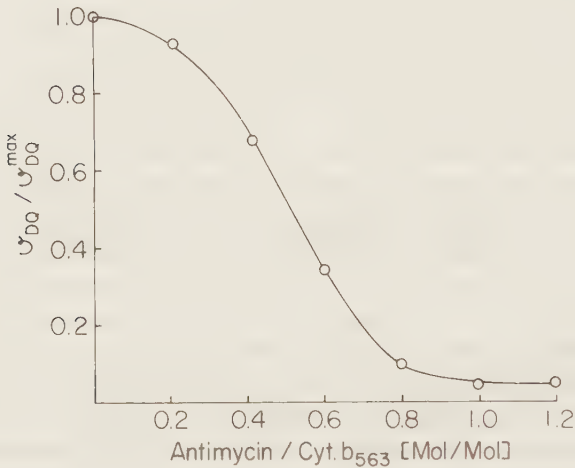


Abb.19 Antimycintitration der Durochinon-Reduktion Die Durochinon-Reduktion wurde mit 5 mM Succinat und 0.1 mM Durochinon (DQ) in Gegenwart von 1 mM KCN bei 270-284 nm bestimmt. Zur Untersuchung dienten submitochondriale Partikel des Wildtyps. Die Proteinkonzentration war 0.3 mg Protein/ml. Die Antimycinzugabe bei jedem Titrationsschritt war 0.04 μ M. Die Ausgangsaktivität der Durochinon-Reduktion (v_{DQ}^{max}) betrug 50 μ Mol. Min^{-1} .(g Protein) $^{-1}$.

prüft. Es war zu zeigen, daß die b-Typ Cytochrome bei der vollständigen Hemmung der Durochinon-Reduktion durch Antimycin ihren maximalen Reduktionsgrad erreichen. Die Experimente hierzu sollen im folgenden Kapitel beschrieben werden.

Auf den nicht-linearen Verlauf der Titrationskurve soll in der Diskussion eingegangen werden.

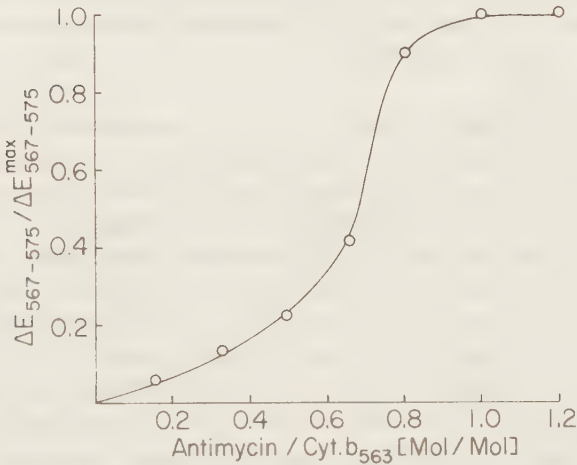


Abb.20 Antimycintitration der Cytochrom b_{563} -Reduktion
Das Experiment wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die Antimycintitration der Durochinon-Reduktion durchgeführt. Gemessen wurde bei 567-575 nm. Die Proteinkonzentration war 2.5 mg Protein/ml. Die Antimycinzugabe bei jedem Titrationsschritt war 0.2 μ M. Der Cytochrom b_{563} -Gehalt der submitochondrialen Partikel des Wildtyps war 0.7 μ Mol/g Protein.

3.4.3. Zunahme des Cytochrom b_{563} -Reduktionsgrades bei Antimycintitrationen

Wie bereits bei der Beschreibung der Cytochromspektren in Kap. 3.1.1. erwähnt, unterscheiden sich Cytochrom b_{557} und Cytochrom b_{563} u.a. dadurch, daß sie verschieden reduzierbar sind. In Gegenwart von KCN wird mit einem Substrat wie Succinat oder mit Durohydrochinon (vergl. Kap. 3.3.3.) Cytochrom b_{557} reduziert, Cytochrom b_{563} dagegen verbleibt im oxidierten Zustand. In Gegenwart von Antimycin kann Cytochrom b_{563} reduziert werden. Die Zunahme des Cytochrom b_{563} -Reduktionsgrades kann stufenweise titriert werden.

Eine Direktmessung ist möglich am Doppelstrahl-Spektrophotometer bei dem Wellenlängenpaar 567-575 nm. In diesem Bereich kann die Absorptionszunahme der α -Bande des Cytochrom b_{563} bei der Reduktion interferenzfrei bestimmt werden (das Maximum der α -Bande liegt bei Raumtemperatur bei 565 nm).

Die Zunahme des Cytochrom b_{563} -Reduktionsgrades wird bei Antimycintitrationen allgemein beobachtet.

In dieser Arbeit wurden i) die Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation über den cyanidunempfindlichen Atmungsweg und ii) die Hemmung der Durochinon-Reduktion durch Succinat beschrieben. Reaktion i) bedeutet die Hemmung des Elektronenflusses von den b-Typ Cytochromen zum Ubichinon; Reaktion ii) beinhaltet sowohl die Hemmung des Elektronenflusses von den b-Typ Cytochromen zum Durochinon als auch die Hemmung des Elektronenaustausches zwischen den b-Typ und den c-Typ Cytochromen, wenngleich die Hemmung des Elektronenflusses von den b-Typ zu den c-Typ Cytochromen nicht registriert werden kann, da sich die Probe für die Messung der Durochinon-Reduktion im KCN-gehemmten Zustand befindet.

Abb. 20 zeigt das Ergebnis eines Antimycintitrations-experiments, welches in einem Parallelversuch wie die Antimycintitration der Durochinon-Reduktion durch Succinat durchgeführt wurde. Als Untersuchungsmaterial dienten ebenso submitochondriale Partikel des Wildtyps im KCN-gehemmten Zustand. Graphisch aufgetragen ist jeweils der relative Reduktionsgrad von Cytochrom b_{563} gegen die Antimycinkonzentration. Zur Bestimmung des relativen Reduktionsgrades wurde das Verhältnis der jeweiligen Extinktion (ΔE) zu der Extinktion bei maximaler Reduktion ($\Delta E^{\max}$) von Cytochrom b_{563} gebildet. Die Antimycinkonzentration wurde wie in Kap. 3.4.2. als molares Verhältnis von Antimycin zu Cytochrom b_{563} angegeben.

Aus der Abbildung geht deutlich hervor, daß der maximale Reduktionsgrad von Cytochrom b_{563} sich einstellt, wenn das molare Verhältnis von Antimycin zu Cytochrom b_{563} den Wert 1 annimmt. Wie bei der Hemmung der Durohydrochinon-Oxidation als auch der Durochinon-Reduktion tritt die maximale Reduktion von Cytochrom b_{563} beim Titer von 1:1:1 für Antimycin/Cytochrom b_{563} /Cytochrom b_{557} ein.

Die Kombination der in Abb. 19 und 20 dargestellten Antimycintitrationen ergibt, daß bei der Antimycinhemmung der Durochinon-Reduktion die b-Typ Cytochrome immer mehr reduziert werden, während die Aktivität der Durochinon-Reduktion immer mehr abnimmt. Hiermit wird bestätigt, daß bei der Titration der Durochinon-Reduktion der Elektronenübergang von den Ferrocyclochromen b_{563} und b_{557} zum Durochinon gehemmt wird.

Auf den nicht-linearen Verlauf der Titrationskurve in Abb. 20 soll in der Diskussion eingegangen werden.

4. Diskussion

4.1. Fragen zum Auftreten und zur Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase in der verzweigten Atmungskette

Eine verzweigte Atmungskette mit einer cyanidunempfindlichen Endoxidase wird in den Mitochondrien zahlreicher höherer Pflanzen und Mikroorganismen gefunden (s. 102).

Bei den höheren Pflanzen wurde beobachtet, daß die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität unter natürlichen Bedingungen auftritt, wenn sich das Gewebe in einem definierten Entwicklungsstadium, bzw. in einem veränderten physiologischen Zustand befindet. So wird häufig, wie beispielsweise bei *Daucus carota* (103), die Cyanidresistenz der Atmung in alterndem Gewebe festgestellt. Ebenso kann, etwa in Scheiben von *Solanum tuberosum* (104), das Auftreten einer cyanidunempfindlichen Aktivität bei der Wundatmung beobachtet werden. Zuweilen weist das Gewebe, welches eine cyanidunempfindliche Atmungsaktivität besitzt, bestimmte Besonderheiten auf. Beispielsweise wurde bereits 1778 von Lamarck auf das außergewöhnlich hohe Maß an Wärmeentwicklung bei der alternden *Spatha* von *Arum* hingewiesen, und Bendall et al. (8) vermerkten, daß sich das Gewebe von etiolierten Bohnenkeimlingen durch sein schnelles Wachstum auszeichnet.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen Phenomena und der Funktion der cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität sowie der Bedeutung dieser Aktivität für die Pflanzen *in vivo* konnte jedoch noch nicht hergeleitet werden.

Auch die möglichen Ursachen des Auftretens der cyanid-

unempfindlichen Oxidase sind wegen der Komplexität des Untersuchungsmaterials bei Pflanzen sehr schwer zu bestimmen. Zur näheren Aufklärung dieser Frage bieten sich Mikroorganismen wie *Neurospora* an.

Es ist bekannt, daß sowohl bei den *mi*-Mutanten als auch im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp von *Neurospora* der mitochondriale Proteinsyntheseapparat in seiner Funktion gehemmt ist. Neuere Untersuchungen (105,106) weisen darauf hin, daß in der *mi-1* Mutante eine Veränderung der mitochondrialen ribosomalen Ribonukleinsäure eingetreten sein könnte. Außerdem wurde ein Überschuß an 50 S Ribosomenuntereinheiten in den Mitochondrien gefunden (107). Beides ist auf eine Mutation im genetischen System der Mitochondrien zurückzuführen, wobei die Anhäufung der großen Ribosomenuntereinheiten möglicherweise auf eine Hemmung der Synthese oder des Zusammenbaus der kleineren Untereinheit zurückzuführen ist (s. 108). Wie beim Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp, in dem die Bindung von Chloramphenicol an die 50 S Ribosomenuntereinheit nachgewiesen wurde, könnte bei den *mi*-Mutanten die Störung der Translation im Endeffekt zur Ausprägung der Mutation führen.

Die Verminderung der Gehalte von Cytochrom a, a_3 und *b* ist dadurch zu erklären, daß ein Teil der Untereinheiten dieser Cytochrome von dem mitochondrialen Proteinsyntheseapparat codiert und synthetisiert wird und von einem Defekt direkt betroffen wird. Eine Anhäufung der cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten dieser Komponenten ist vorstellbar. Somit könnte das Auftreten des in Kap. 3.1.3. beschriebenen dritten *b*-Typ Cytochroms im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp mit der Anhäufung eines cytoplasmatisch synthetisierten Proteins erklärt werden - unter der Annahme, daß die cytoplasmatisch synthetisierte Untereinheit bereits ein Cytochrom darstellen kann.

Zur Erklärung des Anstiegs der Gehalte von Cytochrom c und von Ubichinon sowie der Ausbildung der cyanidunempfindlichen Oxidase muß angenommen werden, daß das mitochondriale und das extramitochondriale Proteinsynthesystem sich gegenseitig durch ihre Produkte beeinflussen können (108,109).

Cytochrom c und Ubichinon sind offensichtlich (44,45) Atmungskettenkomponenten, deren Synthese extramitochondrial gesteuert wird. Die gleiche Annahme dürfte auch für die cyanidunempfindliche Oxidase zutreffen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt (36), daß die Ausbildung der cyanidunempfindlichen Oxidase in Gegenwart von Chloramphenicol durch Cycloheximid gehemmt wird. Bei der Zugabe von Actinomycin anstelle von Cycloheximid erreicht die cyanidunempfindliche Atmungsaktivität nur 40% der Vergleichsaktivität. Diese Befunde dürften die Theorie favorisieren, daß es sich bei der Ausbildung der cyanidunempfindlichen Oxidase um eine de novo Synthese eines im Wildtyp nicht vorhandenen Proteins, also um eine Enzyminduktion handelt.

Bei einem Anstieg der Gehalte von Cytochrom c und von Ubichinon und dem Auftreten der cyanidunempfindlichen Oxidase bei der Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese müßte der Defekt im mitochondrialen Proteinsyntheseparat eine Auswirkung auf das genetisch intakte extramitochondriale Proteinsynthesystem haben. Dabei ist die Frage noch völlig offen, ob die verminderten Gehalte an mitochondrial synthetisierten Proteinen oder etwa die Anhäufung von extramitochondrial synthetisierten aber nicht zum Holoenzym zusammengebauten Proteinen hierbei von Bedeutung sind.

Für Cytochrom c und Ubichinon gilt möglicherweise die Hypothese (110,36), daß entweder die Einbaugeschwindig-

keit in die Mitochondrien oder die Syntheserate der extramitochondrial synthetisierten Komponenten durch den veränderten Gehalt eines von dem Defekt im mitochondrialen Proteinsyntheseapparat direkt betroffenen Proteins beeinflusst wird, d.h. in diesem Fall erhöht wird.

Für die cyanidunempfindliche Oxidase könnte das Modell von Barath et al. (111) zutreffen. In diesem Modell wird die de novo Synthese des Enzyms vorausgesetzt. Es wird postuliert, daß von dem mitochondrialen Proteinsyntheseapparat ein Repressor gebildet wird, welcher auf das extramitochondriale System einwirkt. Wenn die Synthese des Repressors gehemmt oder gestoppt wird, was in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase der Mitochondrien oder auch infolge einer Mutation oder eines künstlichen Eingriffs in die natürliche Entwicklung geschehen kann, tritt die Synthese des cytoplasmatisch synthetisierten Proteins ein. Diese Annahmen sind in der Zwischenzeit von mehreren Arbeitsgruppen, gestützt auf experimentelle Ergebnisse, befürwortet worden (35,36).

Bei der Zucht des Wildtyps von *Neurospora* mit steigenden Chloramphenicol-Konzentrationen wäre die zunehmende Ausbildung der cyanidunempfindlichen Oxidase ein Maß für die abnehmende Menge an Repressor, die entsprechend den Verhältnissen von dem mitochondrialen Proteinsyntheseapparat noch gebildet werden kann.

Es drängt sich die Frage auf, ob ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Repressoraktivität und der bereits besprochenen Abnahme der Gehalte von Cytochrom a, a₃ oder Cytochrom b besteht, d.h. ob etwa eine der Untereinheiten eines dieser Cytochrome als Repressor fungieren kann.

Bei der Untersuchung dieser Frage muß berücksichtigt werden, daß in der mi-3 Mutante von *Neurospora* die cyanid-

unempfindliche Oxidase auftritt, während lediglich der Cytochrom a, a_3 -Gehalt vermindert ist (26), d.h. eine Untereinheit von Cytochrom b als Repressor der Synthese der cyanidunempfindlichen Oxidase scheint nicht in Betracht zu kommen.

Die Theorie, daß eine Untereinheit von Cytochrom a, a_3 eine regulatorische Funktion auf die Transkription der cyanidunempfindlichen Oxidase hat, reicht aus, um die von Schwab (112) durchgeführten sehr interessanten Experimente zu erklären. Schwab hat gefunden, daß wenn *Neurospora crassa* Wildtyp in Kupfer-Mangelmedium gezüchtet wird, Cytochrom a, a_3 - nicht aber Cytochrom b - verlorenght. Gleichzeitig tritt eine hohe cyanidunempfindliche Atmungsaktivität auf. Da unter diesen Bedingungen die Induktion der cyanidunempfindlichen Oxidase nicht mit einer Hemmung der mitochondrialen Translation in Zusammenhang gebracht werden kann, sollte der durch Kupfermangel hervorgerufene Cytochrom a, a_3 -Verlust unmittelbar für das Auftreten der cyanidunempfindlichen Oxidase verantwortlich sein. Ähnliche Versuche mit vergleichbaren Ergebnissen wurden von Downie et al. (113) an *Candida utilis* durchgeführt.

Besonders bemerkenswert sind die neuerdings von Edwards et al. (27,33,36) untersuchten *Neurospora*-Mutanten *cni-1* und *cni-2*. Diese Mutanten (*cni* $\hat{=}$ "cyanide-insensitive") weisen eine cyanidunempfindliche Atmungsaktivität auf. Es handelt sich dabei jedoch im Gegensatz zu den *mi*-Mutanten um chromosomale Mutanten, da die Kreuzungsversuche mit den *cni*-Mutanten den Mendel'schen Gesetzen folgen. Von der Mutation im cytoplasmatischen Proteinsynthesystem scheint gerade Cytochrom a, a_3 betroffen zu sein. Edwards et al. berichten, daß die typische Bande von Cytochrom a, a_3 im Cytochromspektrum der *cni-1* Mutante fehlt. Sie nehmen an, daß eine Störung des "assembly"-

Prozesses des Cytochrom a,a_3 vorliegt. In dem Bericht wird ausdrücklich die Vermutung geäußert, daß es infolge der Veränderung dieser Atmungskettenkomponente zur Ausbildung des cyanidunempfindlichen Atmungsweges kommt.

Die Aufklärung der Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase stellt ein bisher ungelöstes Problem dar.

Die Oxidase läßt sich durch ihre Cyanidunempfindlichkeit und ihre Hemmung durch Hydroxamsäurederivate charakterisieren. Sie überträgt offenbar in einem Zweig der Atmungskette, der keine Cytochrome enthält, die Elektronen von Ubichinon auf Sauerstoff. Die Anzahl der Enzyme, die an dieser Reaktionsfolge beteiligt sind, ist unbekannt. Die Untersuchungen von Erecinska et al. (114) geben Anhalt dafür, daß in der verzweigten Atmungskette zwei Flavoproteine am Elektronentransport beteiligt sind. Eines davon (F_{pha}) soll im cyanidunempfindlichen Weg, das andere (F_{phf}) im cyanidhemmbaren Weg des Elektronenflusses lokalisiert sein. Beide Flavoproteine werden durch Succinat reduziert, F_{phf} zeigt jedoch im Gegensatz zu F_{pha} keine Reduktionszunahme bei Zugabe von Cyanid oder Antimycin. Die Oxidationskinetik dieses Flavoproteins ist jedoch relativ langsam, so daß F_{phf} zwar als Komponente des cyanidunempfindlichen Atmungsweges in Frage kommt, aber nicht als Endoxidase fungieren kann. Zudem haben Untersuchungen sowohl an Mikroorganismen (115) als auch an höheren Pflanzen (116,8) ergeben, daß als Endprodukt der Oxidation bei der cyanidunempfindlichen Atmung in gleicher Weise wie bei der Reaktion über Cytochrom a,a_3 offenbar Wasser entsteht. Dieser Befund ist ebenfalls ein Hinweis dafür, daß das Enzym, welches die Aktivierung des Sauerstoffs katalysiert, nicht ein Flavoprotein ist, da ein Enzym dieser Natur allgemein zur Bildung von H_2O_2 führt (8,102).

Wie bereits erwähnt, sprechen vorläufige Untersuchungen

für das Vorkommen von Eisen-Schwefel-Proteinen - d.h. Proteinen, in denen Eisenatome in Verbindung mit labilen Schwefelatomen vorliegen - als Komponenten des cyanidunempfindlichen Atmungsweges.

Ein Eisen-Schwefel-Protein als Endoxidase bei diesem Elektronentransport wäre denkbar. Als Anhalt dafür gilt insbesondere die spezifische Hemmung der cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität durch Hydroxamsäurederivate sowie die Erhöhung des ESR-Signals im Bereich $g \approx 2$, welche in submitochondrialen Partikeln von *Symplocarpus foetidus* im anaeroben Zustand nach Zugabe eines Hydroxamsäurederivats registriert wird (20).

Allerdings konnte bisher noch kein neu auftretendes ESR-Signal gemessen werden, etwa bei der Wundatmung, wenn es zur Ausbildung der cyanidunempfindlichen Atmungsaktivität in vormals cyanidempfindlichen Gewebe kommt (117).

Ebensowenig scheint der Gehalt an Eisen-Schwefel-Proteinen in Mitochondrien, die eine verzweigte Atmungskette haben, höher zu sein als in Mitochondrien, die eine unverzweigte Kette besitzen. Im Rahmen der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden die Eisengehalte von Mitochondrien des Wildtyps und des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps bestimmt. Es wurde kein wesentlicher Unterschied in dem nicht-Häm-Eisen-Gehalt der zwei verschiedenen Präparationen gefunden (auf die einzelnen quantitativen Daten soll hier nicht näher eingegangen werden). Dieses Ergebnis steht mit dem Bericht von Dizengremel et al. (118) im Einklang. Bei der Untersuchung von sieben verschiedenen Pflanzenarten, deren Atmung in unterschiedlichem Maße cyanidhemmbar ist (z.B. ist *Helianthus tuberosus* zu etwa 98%, *Sauromattum guttatum* nahezu 0% cyanidhemmbar) wurden für die Gehalte an Eisen-Schwefel-Proteinen in den einzelnen Arten vergleichbare Werte bestimmt.

Die Annahme, daß der Anstieg des Gehaltes eines bestimmten Eisen-Schwefel-Proteins gekoppelt sein könnte mit der Abnahme des Gehaltes eines anderen, so daß in der Gesamtbilanz die Werte unverändert erscheinen, ist bisher lediglich eine Vermutung.

Zur weiteren Aufklärung der Natur der cyanidunempfindlichen Oxidase ist eine Anreicherung bzw. Isolierung dieses Enzyms notwendig. Dies erfordert zuvor das Auffinden eines spezifischen Elektronendonors und -akzeptors, was die Ausarbeitung eines zuverlässigen Tests ermöglichen würde. Als Elektronendonator käme ein Chinoderivat mit dem geeigneten Redoxpotential, welches zudem nicht mit einer Komponente der unverzweigten Atmungskette reagiert und nicht autoxidabel ist, in Frage. Als Elektronenakzeptor könnte dann z.B. Ferricyanid dienen.

Auch die Lokalisierung der cyanidunempfindlichen Oxidase in den Mitochondrien muß noch aufgeklärt werden.

Wenn die Annahme zutrifft, daß die innere Mitochondrienmembran für Hydroxamsäuren undurchlässig ist (20), sollte die cyanidunempfindliche Oxidase auf der Außenseite der Innenmembran lokalisiert sein. Dort wäre das Enzym für seine spezifischen Hemmstoffe zugänglich, da die äußere Mitochondrienmembran kein Hindernis für Moleküle von der Größe etwa der Salicylhydroxamsäure darstellt. Auch die Tatsache, daß der Hemmstoff aus den Mitochondrien herausgewaschen werden kann und damit die Hemmung der cyanidunempfindlichen Oxidase aufgehoben wird (20), fände hierin eine Erklärung.

Die Lokalisierung der Oxidase auf der Außenseite der Mitochondrien-Innenmembran könnte zur Folge haben, daß das Enzym, ähnlich wie Cytochrom c, leicht in Lösung geht. Nach der Präparation der submitochondrialen Partikel durch

Ultraschall sollte die Aktivität den Partikeln fehlen und im Überstand zu bestimmen sein. Bei *Neurospora* sind jedoch sowohl die Partikelsuspension als auch der Beschallungsüberstand inaktiv und alle bisher unternommenen Reaktivierungsversuche waren ebenfalls erfolglos. Die Frage, ob die Oxidase bei der Behandlung tatsächlich in Lösung geht, ob sie denaturiert wird, oder etwa durch den Verlust von Phospholipiden inaktiviert wird, muß zunächst noch offen bleiben. Bei der Präparation von Schallpartikeln aus den Mitochondrien höherer Pflanzen bleibt die Aktivität angeblich auch nach der Ultraschallbehandlung in den Partikeln erhalten (8). Es steht aus, zu klären, ob diese Ergebnisse einen prinzipiellen Unterschied zwischen den beiden cyanidunempfindlichen Oxidasen widerspiegeln oder lediglich auf einer verschiedenen Methode der Ultraschallbehandlung beruhen.

4.2. Ubichinon als Redoxüberträger zwischen den Dehydrogenasen, den b-Typ Cytochromen und der cyanidunempfindlichen Oxidase

Die Ubichinon-Extraktions-Reinkorporations-Experimente beweisen, daß Ubichinon eine essentielle Komponente zur Aufrechterhaltung sowohl der cyanidhemmbaren Atmungsaktivität von Mitochondrien des Wildtyps als auch der cyanidhemmbaren und der cyanidunempfindlichen Atmungsaktivitäten von Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps ist. Die gemessenen Aktivitäten verändern sich in Abhängigkeit von dem Ubichinongehalt der Mitochondrien nach Extraktion oder Reinkorporation.

Es ist durchaus möglich, daß Ubichinon die Redoxäquivalente, die von den natürlichen Substraten Succinat oder NADH über die Dehydrogenasen geliefert werden, weder direkt auf die b-Typ Cytochrome noch auf die cyanidun-

empfindliche Oxidase überträgt, sondern daß weitere Komponenten des Elektronentransports, wie etwa die in diesen Abschnitten lokalisierten nicht-Häm-Eisen-Proteine (119), zwischengeschaltet sind. Es ist jedoch durch die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente geklärt worden, daß Ubichinon als verbindende Komponente zwischen den einzelnen Dehydrogenasen, den Cytochromketten und dem cyanidunempfindlichen Abschnitt der Atmungskette fungiert.

Bei der Durohydrochinon-Oxidation über den cyanidunempfindlichen Weg der verzweigten Atmungskette verbindet Ubichinon die b-Typ Cytochrome, mit denen es im ungehemmten oder im KCN-gehemmten Zustand im Gleichgewicht steht, mit der cyanidunempfindlichen Oxidase.

Ubichinon eignet sich in besonderem Maße für die oben genannten Funktionen, da es ein lipidlösliches, sehr kleines Molekül ohne Proteinanteil ist. Die Dehydrogenasen und die Cytochrome liegen dagegen zumindest teilweise in membran-gebundener Form in der Atmungskette vor, wobei bekannterweise das Verhältnis der Gehalte von Dehydrogenasen zu Cytochromketten etwa 1:10 beträgt (87). Für die cyanidunempfindliche Oxidase ist noch nichts Näheres bezüglich der Größe des Enzyms und seiner Anordnung in der Membran bekannt. Es könnte sich jedoch auch bei diesem Enzym um eine membrangebundene Komponente handeln, die in einer nicht-stöchiometrischen Anordnung zu den Dehydrogenasen steht.

Ragan et al. (120) haben gezeigt, daß Ubichinon sowohl mit Flavoproteinen als auch mit Cytochromen reagiert. Die Reaktion mit einem zusätzlichen Flavoprotein des cyanidunempfindlichen Atmungsweges, wie etwa des bereits erwähnten Flavoproteins F_{phf} sollte deshalb ebenso möglich sein.

Die Überbrückung der nicht-stöchiometrischen Anordnung der einzelnen Komponenten durch die Mobilität des Carriers

Ubichinon wurde von Kröger et al. (87,88) bewiesen. Sie zeigten, daß Ubichinon im stöchiometrischen Überfluß gegenüber den anderen Komponenten in der Atmungskette in einem sogenannten "Pool" vorliegt. Es kann als mobiler Elektronenüberträger den Wasserstoff von den verschiedenen Dehydrogenasen übernehmen und unter Abspaltung von Protonen die Elektronen statistisch an die Cytochromketten weiterleiten. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Ubichinon innerhalb der Mitochondrienmembran soll, nach Berechnungen von G. Adam (unveröffentlicht), schnell genug sein, um dieser Aufgabe gerecht zu werden.

Von Jagow et al. (26) haben an Mitochondrien des Wildtyps und der mi-1 Mutante von *Neurospora* vergleichende Hemmstofftitrationen der Atmungsaktivitäten und der Ubichinonreduktion mit den Substraten NADH und Succinat durchgeführt. Mit diesen Experimenten wurde bereits gezeigt, daß Ubichinon an beiden Atmungswegen in der Mutante beteiligt ist und als Komponente, die die Verzweigung des Elektronenflusses ermöglicht, in Frage kommt. Zusätzlich hat die Bestimmung der Phosphorylierungsausbeute von Mitochondrien in gekoppeltem Zustand ergeben, daß die Atmungskette des Wildtyps mit den drei bekannten Energieübertragungsstellen ausgestattet ist, der cyanidunempfindliche Weg in der verzweigten Atmungskette dagegen nur die erste Phosphorylierungsstelle enthält. Auch dieser Befund spricht für die Funktion von Ubichinon als verzweigende Komponente, da die zweite und die dritte Phosphorylierungsstelle im Cytochromkettenbereich lokalisiert sind.

Die energieabhängige Oxidation von Ascorbat + TMPD über den cyanidunempfindlichen Atmungsweg, wie sie in Mitochondrien von *Phaseolus aureus* gemessen wird (121), ist ein weiterer Befund, der durch das hier angeführte Modell erklärt werden kann.

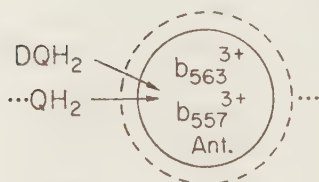
4.3. Neue Aspekte zum Mechanismus der Antimycinhemmung und zur Funktion der b-Typ Cytochrome

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Antimycin auf
i) die cyanidunempfindliche Atmung von Mitochondrien des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps mit den Substraten Succinat oder NADH und dem Elektronendonator Durohydrochinon,
ii) den Elektronentransport von den b-Typ Cytochromen zu Ubichinon in submitochondrialen Partikeln des Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyps mit Durohydrochinon, sowie
iii) den Elektronentransport von den b-Typ Cytochromen zu Durochinon in Partikeln des Wildtyps im KCN-gehemmten Zustand mit Succinat beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, i) daß Durohydrochinon wie Succinat oder NADH in der verzweigten Atmungskette sowohl über den cyanidhemmbaren als auch über den cyanidunempfindlichen Weg oxidiert wird; daß jedoch die Durohydrochinon-Oxidation über den cyanidunempfindlichen Weg durch Antimycin gehemmt wird, die Succinat- oder NADH-Atmung dagegen nicht; ii) daß der Elektronentransport von Durohydrochinon zu Ubichinon, welcher im KCN-gehemmten Zustand stattfindet, im Antimycin-gehemmten Zustand blockiert ist und iii) daß die Reduktion von Durochinon mit Succinat im KCN-gehemmten Zustand durch Antimycin gehemmt wird.

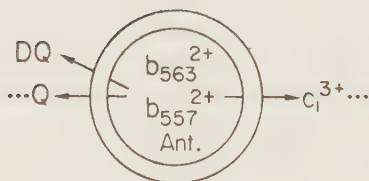
Wenn Antimycin den Elektronentransport von den b-Typ Cytochromen zu Cytochrom c_1 hemmt, ist offenbar der Elektronenaustausch mit Ubichinon und mit Durochinon ebenfalls blockiert. Die Hämgruppen von Cytochrom b_{563} und Cytochrom b_{557} liegen dann beide im reduzierten Zustand vor. Der Titer für die vollständige Hemmung des Elektronentransports ist ein Mol Antimycin pro Mol Cytochrom b_{563} oder Cytochrom b_{557} , d.h. ein Molekül Antimycin pro zwei Moleküle zweier verschiedener b-Typ Cytochrome.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Antimycin-titrations haben Titrationskurven mit nicht-linearem Verlauf ergeben.



A) Übergangszustand

Antimycin wird gebunden, die Reduktion der beiden b-Typ Cytochrome wird nicht verhindert.



B) Antimycin-gehemmter Zustand

Das gebundene Antimycin verhindert die Reoxidation der beiden b-Typ Cytochrome.

Abb.21 Schema des Mechanismus der Antimycinwirkung auf den Cytochrom b-Komplex Die ausführliche Erklärung des Schemas wird im Text gegeben. Antimycin (Ant.) wird an die bisher noch unbekannte Bindungsstelle einer Komponente des Komplexes gebunden. Diese Komponente kann eines der beiden b-Typ Cytochrome oder eine weitere noch nicht näher definierte Untereinheit sein. Die Parallelanordnung der zwei b-Typ Cytochrome in diesem Schema soll nicht ihre Anordnung in der Atmungskette angeben. Q, QH₂: Ubichinon, Ubihydrochinon; DQ, DQH₂: Durochinon, Durohydrochinon.

Zur Interpretation der Ergebnisse soll das hypothetische Schema des Mechanismus der Antimycinwirkung in Abb. 21 dienen. Es ist bekannt (91,92), daß Antimycin gebunden wird, wenn die b-Typ Cytochrome im oxidierten (Abb. 21A) oder im teilweise reduzierten (wie in Abb. 16A dargestellt) Zustand vorliegen. Der "Übergangszustand" in Abb. 21A stellt das System in der Abwesenheit von Substrat oder eines Elektronendonors dar: Antimycin wird gebunden, aber die Hämgruppen der b-Typ Cytochrome verbleiben im oxidierten Zustand. Bei der Zugabe eines Elektronendonors (angedeutet durch die ausgezogenen Pfeile in Abb. 21A) werden die b-Typ Cytochrome augenblicklich reduziert und die Antimycinhemmung tritt ein (Abb. 21B).

Da es unwahrscheinlich ist, daß ein Molekül Antimycin gleichzeitig an zwei verschiedene Moleküle von Cytochrom b gebunden wird, liegt die Annahme nahe, daß die beiden b-Typ Cytochrome einen binären Komplex bilden. In diesem Komplex dürften die zwei Cytochrome in enger Wechselwirkung stehen. Dies ist im Schema mit dem inneren Kreis, der die beiden b-Typ Cytochrome umgibt, angezeigt. Der äußere Kreis soll die Bindung ohne Hemmwirkung (durchbrochene Linie, Abb. 21A) und die Bindung mit Hemmwirkung (durchgezogene Linie, Abb. 21B) des Antimycins darstellen.

Bisher gibt es keinen Beweis für die Existenz eines binären Komplexes, der aus den beiden b-Typ Cytochromen zusammengesetzt wäre. Eine gewisse Unterstützung findet diese Annahme jedoch durch die Tatsache, daß die zwei Cytochrome in den bis jetzt untersuchten Spezies (*Saccharomyces carsbergensis*, *Neurospora crassa*, *Locusta migratoria*, *Musca domestica* und Rinderherz, v. Jagow, unveröffentlicht, persönliche Mitteilung) sowie in der mi-1 Mutante (26) und, wie hier gezeigt, im Chloramphenicol-gezüchteten Wildtyp von *Neurospora* in äquimolarer Stöchiometrie vorliegen.

Weiss et al. (70,71) ist die Isolierung eines Cytochrom b aus *Neurospora* gelungen. Das Protein stellt sich, wenn es in Desoxycholat gelöst ist, als Dimer dar. Es kann chromatographisch (durch Natrium-dodecylsulfat Gelelektrophorese) in zwei Untereinheiten aufgetrennt werden. Ungeklärt ist noch, ob die Präparation Cytochrom b_{563} , Cytochrom b_{557} oder beide Cytochrome darstellt. Das von Weiss isolierte Cytochrom b bindet kein Antimycin. Es stellt sich die Frage, ob in Zukunft alle isolierte b-Typ Cytochrome keine Antimycinbindung zeigen werden, oder ob der Verlust dieser Fähigkeit der Ausdruck eines bestimmten Grades der Denaturierung dieses Proteins ist.

Der effektive Antimycin-Bindungsort ist nicht bekannt. Die Bindung von Antimycin an eine Komponente, die nicht mit einem b-Typ Cytochrom identisch ist, kann somit nicht ausgeschlossen werden. In einer kürzlich erschienenen Arbeit (122) wird ein Protein beschrieben, welches angeblich die Antimycin-Bindungsstelle beinhaltet, aber kein b-Typ Cytochrom ist. Dies würde allerdings dann erfordern, daß der oben beschriebene Komplex aus noch mehr als zwei Molekülen aufgebaut ist.

Die Art der Bindung ist - ganz unabhängig davon, an welche Untereinheit des Komplexes das Antimycin gebunden wird - auch noch nicht völlig geklärt. Slater et al. (90,92,123) haben Antimycin-Bindungsstudien an submitochondrialen Partikeln durchgeführt und geben an, daß Antimycin in Abhängigkeit vom energetischen Zustand in kooperativer oder nicht-kooperativer Weise gebunden werden kann. Aber selbst den Autoren erscheint eine eindeutige Analyse der Bindungskurven wegen der extrem niedrigen Dissoziationskonstante von Antimycin sehr problematisch.

Es sei in der hier angeführten Interpretation des Mechanismus der Antimycinwirkung vorausgesetzt, daß die Bindung von

Antimycin unter allen Umständen in linearer Weise erfolgt, d.h. daß die Menge an zugegebenem Antimycin gleich der Menge an gebundenem Antimycin ist, solange, bis die Antimycin-Bindungsstelle mit Hemmstoff gesättigt ist.

Unter der Annahme einer linearen Bindung von Antimycin deutet der nicht-lineare Verlauf der Titrationskurve der Durohydrochinon-Oxidation und der Durochinon-Reduktion auf eine nicht-lineare Hemmung des Elektronentransports von den b-Typ Cytochromen zu Ubichinon oder zu Durochinon durch Antimycin hin. Es liegt der Gedanke nahe, daß der Elektronenaustausch zwischen dem Cytochrom b-Komplex und Ubichinon oder Durochinon über die gleiche Reaktionsstelle verläuft.

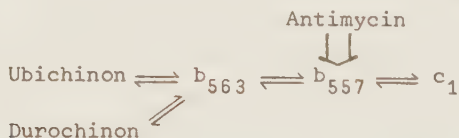
Der Reduktionsgrad von Cytochrom b_{563} bei der Antimycintitration im KCN-gehemmten Zustand, wiedergegeben in einer Kurve mit ebenfalls nicht-linearem Verlauf (Abb. 20), könnte die Menge an Antimycin darstellen, die bei der Hemmung des Elektronentransports von den b-Typ Cytochromen zu Ubichinon (oder zu Durochinon) tatsächlich wirksam ist: Bei der Durchführung der Titration ist nur ein Teil des gebundenen Antimycins wirksam. Erst wenn der Antimycin-Bindungsort am Cytochrom b-Komplex mit dem Hemmstoff gesättigt ist, wird die volle Menge an gebundenem Antimycin wirksam und es wird auch die volle Hemmwirkung erreicht.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen, welche die Wechselwirkung zwischen den b-Typ Cytochromen und Ubichinon oder Durochinon betrifft, haben frühere Untersuchungen ergeben, daß die Hemmung des Elektronentransports von den b-Typ Cytochromen zu Cytochrom c_1 in linearer Weise erfolgt (101).

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die Existenz zweier verschiedener Reaktionsstellen des Elektronenaus-

tauschs am Cytochrom b-Komplex andeuten. Es muß in Erwägung gezogen werden, daß die b-Typ Cytochrome in der Atmungskette einen Komplex bilden, der so angeordnet ist, daß die substratseitig lokalisierte Untereinheit nur mit Ubichinon bzw. Durochinon reagiert und keinen Hemmstoff bindet, die sauerstoffseitig lokalisierte Untereinheit dagegen Antimycin bindet und nur mit Cytochrom c_1 reagiert. Die lineare Bindung von Antimycin hätte eine lineare Hemmung der Reaktion zwischen den b-Typ Cytochromen und Cytochrom c_1 zur Folge. Die Reaktion zwischen den b-Typ Cytochromen und Ubichinon oder Durochinon würde jedoch erst indirekt, mittels eines kooperativen Effektes, d.h. durch Wechselwirkung zwischen den beiden b-Typ Cytochromen, gehemmt werden.

Bisher konnte die Sequenz der b-Typ Cytochrome in der Atmungskette noch nicht mit Sicherheit festgelegt werden. Die kinetischen Studien von Chance et al. (86) geben Anhalt für die in Abb. 12 und 16 angegebene Reihenfolge. Die nun hier aufgestellte Hypothese zur Antimycinwirkung und zur Funktion der b-Typ Cytochrome würde jedoch eher für eine umgekehrte Sequenz der Komponenten sprechen. Das folgende Schema gibt diese Reihenfolge wieder:



Diese Anordnung könnte auch zur Erklärung der nicht-linearen Zunahme des Reduktionsgrades von Cytochrom b_{563} bei der Antimycintitration im KCN-gehemmten Zustand dienen. Wie bei der Hemmung der Ubichinon- und der Durochinon-Reduktion dürfte die Zunahme des Reduktionsgrades von Cytochrom b_{563} durch eine indirekte Wirkung des Antimycins hervorgerufen werden.

Literaturverzeichnis

- 1) Van Herk, A.W.H., Proc. Acad. Sci. Amsterdam 40
(1937) 607
- 2) Van Herk, A.W.H., Proc. Acad. Sci. Amsterdam 40
(1937) 709
- 3) Van Herk, A.W.H., Rec. Trav. Bot. Neerland. 34 (1937)
69
- 4) Yocum, C.S. and Hackett, D.P., Plant Physiol. 32
(1957) 186
- 5) Chance, B. and Hackett, D.P., Plant Physiol. 34
(1959) 33
- 6) Bendall, D.S. and Hill, R., New Phytol. 55 (1956) 206
- 7) Bendall, D.S., Biochem. J. 70 (1958) 381
- 8) Bendall, D.S. and Bonner, W.D., Plant Physiol. 47
(1971) 236
- 9) Storey, B.T. and Bahr, J.T., Plant Physiol. 44 (1969)
115
- 10) Storey, B.T. and Bahr, J.T., Plant Physiol. 44 (1969)
126
- 11) Van Herk, A.W.H. and Badenhuizen, N.P., Proc. Acad.
Sci. Amsterdam 37 (1934) 99
- 12) Hackett, D.P., J. exp. Bot. 8 (1957) 157
- 13) Bonner, W.D., in Methods in Enzymology (P.S. Colowick
and N.O. Kaplan, eds.) Academic Press, New York 1967,
Bd. X, S. 126
- 14) James, W.O. and Elliott, D.C., Nature, Lond. 175
(1955) 89
- 15) Lance, C. and Bonner, W.D., Plant Physiol. 43 (1968)
765
- 16) Bonner, W.D., Fed. Proc. 24 (1965) 297
- 17) Bahr, J.T. and Bonner, W.D., J. biol. Chem. 248 (1973)
3441
- 18) Bahr, J.T. and Bonner, W.D., J. biol. Chem. 248 (1973)
3446

- 19) Okuniki, K., *Acta Phytochim.* 11 (1939) 27
- 20) Schonbaum, G.S., Bonner, W.D., Storey, B.T. and Bahr, J.T., *Plant Physiol.* 47 (1971) 124
- 21) Henry, M.F., de Troostembergh, J.C. and Nyns, E.J., *Arch. int. Physiol. Biochim.* 81 (1973) 971
- 22) Weiss, H., von Jagow, G., Klingenberg, M. and Bücher, Th., *Eur. J. Biochem.* 14 (1970) 75
- 23) Hall, D.O. and Greenawalt, J.W., *Microbiology* 48 (1967) 419
- 24) Eakin, R.T. and Mitchell, H.K., *J. Bact.* 104 (1970) 74
- 25) Lambowitz, A.M. and Slayman, C.W., *J. Bact.* 108 (1971) 1087
- 26) von Jagow, G., Weiss, H. and Klingenberg, M., *Eur. J. Biochem.* 33 (1973) 140
- 27) Edwards, D.L., Kwiecinski, F. and Horstmann, J., *J. Bact.* 114 (1973) 164
- 28) Sebald, W., Hofstötter, T., Hacker, D. and Bücher, Th., *FEBS Lett.* 2 (1969) 177
- 29) Sebald, W., Schwab, A.J. and Bücher, Th., *FEBS Lett.* 4 (1969) 243
- 30) Sebald, W., Schwab, A.J. and Bücher, Th., in *Inhibitors Tools in Cell Research*, Spriger Verlag 1969, S. 140
- 31) Lambowitz, A.M., Slayman, C.W., Slayman, C.L. and Bonner, W.D., *J. biol. Chem.* 247 (1972) 1536
- 32) Lambowitz, A.M., Smith, E.W. and Slayman, C.W., *J. biol. Chem.* 247 (1972) 4850
- 33) Edwards, D.L. and Kwiecinski, F., *J. Bact.* 116 (1973) 610
- 34) von Jagow, G. and Klingenberg, M., *FEBS Lett.* 3 (1972) 278
- 35) Colvin, H.J., Sauer, B.L. and Munkres, K.D., *J. Bact.* 116 (1973) 1314
- 36) Edwards, D.L., Rosenberg, E. and Maroney, P.A., *J. biol. Chem.* 249 (1974) 3551
- 37) Mitchell, M.B. and Mitchell, H.K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38 (1952) 442

- 38) Mitchell, M.B., Mitchell, H.K. and Tissières, A.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 39 (1953) 606
- 39) Haskins, F.A., Tissières, A., Mitchell, H.K. and
Mitchell, M.B., J. biol. Chem. 200 (1953) 819
- 40) Tissières, A., Mitchell, H.K. and Haskins, F.A., J.
biol. Chem. 205 (1953) 423
- 41) Tissières, A. and Mitchell, H.K., J. biol. Chem. 208
(1954) 241
- 42) Borst, P., Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 333
- 43) McLean, J.R., Cohn, G.L., Brandt, I.K. and Simpson,
M.V., J. biol. Chem. 233 (1958) 756
- 44) Schatz, G. and Saltzgaber, J., Biochem. Biophys. Res.
Commun. 37 (1969) 996
- 45) Mahler, H.R., Feldman, F., Phan, S.H., Hamill, P. and
Dawidowicz, K. in International Conference on the Bio-
genesis of Mitochondria, Bari, Italy (A.M. Kroon and
C. Saccone, eds.) Academic Press, New York 1974
- 46) Tzagoloff, A., Rubin, M.S. and Sierra, M.F., Biochim.
Biophys. Acta 301 (1973) 71
- 47) Bertrand, H. and Pittinger, T.H., Mol. Gen. Genet.
117 (1972) 82
- 48) Mager, J., Biochim. Biophys. Acta 38 (1960) 150
- 49) Clark-Walker, G.D. and Linnane, A.W., Biochem. Biophys.
Res. Commun. 25 (1966) 8
- 50) Lamb, A.J., Clark-Walker, G.D. and Linnane, A.W.,
Biochim. Biophys. Acta 161 (1968) 415
- 51) Vázquez, D., Staehelin, T., Celma, M.L., Battaner, E.,
Fernández-Muñoz, R. and Monro, R.E., in Inhibitors
Tools in Cell Research, Springer Verlag 1969, S. 100
- 52) Petermann, M.L., in The Physical and Chemical Proper-
ties of Ribosomes, Amsterdam: Elsevier 1964
- 53) Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A.
and Burholder, P.R., Science 106 (1947) 417
- 54) Gale, E.F. and Folkes, J.P., Biochem. J. 53 (1953) 493
- 55) Rendi, R. and Ochoa, S.J., J. biol. Chem. 237 (1962)
3711

- 56) Vázquez, D., Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 277
- 57) Vázquez, D., Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 289
- 58) Smillie, R.M., Evans, W.R. and Lyman, H., Brookhaven Symposia in Biology 16 (1963) 89
- 59) Monro, R.E. and Vázquez, D., J. molec. Biol. 28 (1967) 161
- 60) Vázquez, D. and Monro, R.E., Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 155
- 61) Fassin, W., Hengel, R. and Klein, P.Z., Hyg. Infkrkh. 141 (1955) 363
- 62) Allison, J.L., Hartmann, R., Wolfe, A.D., Ciak, J. and Hahn, F.E., J. Bact. 83 (1962) 609
- 63) Eisenstadt, J.M. and Brawermann, G., J. Mol. Biol. 10 (1964) 392
- 64) Taylor, F.J., J. Gen. Microbiol. 39 (1965) 275
- 65) Mason, T.L. and Schatz, G., J. biol. Chem. 248 (1973) 1355
- 66) Ebner, E., Mason, T.L. and Schatz, G., J. biol. Chem. 248 (1973) 5369
- 67) Tzagoloff, A. and Meagher, P., J. biol. Chem. 247 (1972) 594
- 68) Rubin, M.S. and Tzagoloff, A., J. biol. Chem. 248 (1973) 4275
- 69) Sebald, W., Machleidt, W. and Otto, J., Eur. J. Biochem 38 (1973) 311
- 70) Weiss, H., Eur. J. Biochem. 30 (1972) 469
- 71) Weiss, H. and Ziganke, B., Eur. J. Biochem. 41 (1974) 63
- 72) Siegel, M.R. and Sisler, H.D., Biochim. Biophys. Acta 103 (1965) 558
- 73) Ernster, L., Lee, I.Y., Norling, B. and Persson, B., Eur. J. Biochem. 9 (1969) 299
- 74) Aquila, H., Doktorthesis, Naturwiss. Fakultät der J.W. Goethe Universität, Frankfurt/Main, 1969, S. 63

- 75) Chance, B., in *Methods in Enzymology* (P.S. Colowick and N.O. Kaplan, eds.) Academic Press, New York 1957, Bd. IV, S. 314
- 76) Keilin, D. and Hartree, E.F., *Nature* 164 (1949) 254
- 77) van Gelder, B.R., *Biochim. Biophys. Acta* 118 (1966) 36
- 78) Zaugg, W.S. and Rieske, J.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9 (1962) 213
- 79) Margoliash, E. and Frohwirt, N., *Biochem. J.* 71 (1959) 520
- 80) Kröger, A. and Klingenberg, M., *Biochem. Z.* 344 (1965) 317
- 81) Beisenherz, G., Bolze, H.J., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. and Pfeleiderer, G., *Z. Naturforsch.* 86 (1953) 555
- 82) Estabrook, R.W., *J. biol. Chem.* 223 (1956) 781
- 83) Keilin, D. and Hartree, E.F., *Nature* 176 (1955) 200
- 84) Chance, B. and Williams, G.R., *Advanc. Enzymol.* 17 (1956) 65
- 85) Lambowitz, A.M. and Bonner, W.D., *J. biol. Chem.* 249 (1974) 2886
- 86) Chance, B., Wilson, D.F., Dutton, P.L. and Erecinska, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66 (1970) 1175
- 87) Klingenberg, M. and Kröger, A., in *Electron Transport and Energy Conservation* (J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater, eds.) Adriatica Editrice, Bari 1970, S. 135
- 88) Kröger, A. and Klingenberg, M., *Eur. J. Biochem.* 34 (1973) 358
- 89) van Gelder, B.F. and Muijers, A.O., *Biochim. Biophys. Acta* 118 (1966) 47
- 90) Bryla, A.J., Kaniuga, Z. and Slater, E.C., *Biochim. Biophys. Acta.* 189 (1969) 317
- 91) Slater, E.C., *Biochim. Biophys. Acta* 301 (1973) 129
- 92) Berden, A.J. and Slater, E.C., *Biochim. Biophys. Acta* 256 (1972) 199

- 93) Ikuma, H., Ann. Rev. Pl. Physiol. 23 (1972) 419
- 94) von Jagow, G. in Die Atmungskette in den niederen Eukaryonten *Saccharomyces carlsbergensis* und *Neurospora crassa*, Habilitationsschrift, Universität München, 1973
- 95) Norling, B., Glazek, E., Nelson, B.D. and Ernster, L., Eur. J. Biochem. 117 (1974) 475
- 96) Ruzicka, F.J. and Crane, F.L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 249
- 97) Ruzicka, F.J. and Crane, F.L., Biochim. Biophys. Acta 226 (1971) 221
- 98) Boveris, A., Oshino, R., Erecinska, M. and Chance, B., Biochim. Biophys. Acta 245 (1971) 1
- 99) Boveris, A., Erecinska, M. and Wagner, M., Biochim. Biophys. Acta 256 (1972) 223
- 100) Kröger, A., in Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes (G.F. Azzone et al. eds.) Academic Press, New York 1972, S. 101
- 101) Kröger, A. and Klingenberg, M., Eur. J. Biochem. 39 (1973) 313
- 102) Henry, M.F. and Nyns, E.J., Sub-Cell. Biochem. 4 (1975) 1
- 103) Marsh, P.B. and Goddard, D.R., Am. J. Bot. 26 (1939) 724
- 104) Hackett, D.P., Haas, D.W., Griffiths, S.K. and Niederpruem, D.J., Plant Physiol. 35 (1960) 8
- 105) Scott, W.A. and Mitchell, H.K., Biochemistry 8 (1969) 4282
- 106) Brambl, R.M. and Woodward, D.O., Nature New Biol. 238 (1972) 198
- 107) Rifkin, M.R. and Luck, D.J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 287
- 108) Schatz, G. and Mason, T.L., Ann. Rev. Biochem. 43 (1974) 51
- 109) Ashwell, M. and Work, T.S., Ann. Rev. Biochem. 39 (1970) 251

- 110) Barath, Z. and Küntzel, H., Nature New Biol. 240
(1972) 195
- 111) Barath, Z. and Küntzel, H., Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 69 (1972) 1371
- 112) Schwab, A.J., FEBS Lett. 35 (1973) 63
- 113) Downie, J.A. and Garland, P.B., Biochem. J. 134 (1973)
1051
- 114) Erecinska, M. and Storey, B.T., Plant Physiol. 46
(1970) 618
- 115) Mizushima, S. and Arima, K., J. Biochem. Tokyo 47
(1960) 351
- 116) Sharpless, T.K. and Butow, R.A., J. biol. Chem. 245
(1970) 58
- 117) Cammack, R. and Palmer, J.M., Ann. N.Y. Acad. Sci.
222 (1974) 816
- 118) Dizengremel, P., Chauveau, M. and Lance, C., C.r.hebd.
Séanc. Acad. Sci. Paris 277, série D (1973) 239
- 119) Ohnishi, T., Wilson, D.F., Asakura, T. and Chance, B.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46 (1972) 1634
- 120) Ragan, C.I. and Racker, E., J. biol. Chem. 248 (1973)
2563
- 121) Wilson, S.B. and Moore, A.L., in Vorbereitung
- 122) Gupta, U. and Rieske, J.S., Biochem. Biophys. Res.
Commun. 54 (1973) 1247

Lebenslauf

Am 21. März 1947 wurde ich als Tochter des Exportkaufmannes Josef A. Bohrer und seiner Ehefrau Eva, geb. Lipschütz, in Madrid / Spanien geboren.

Von 1951 bis 1960 besuchte ich dort die Englische Schule (British Institute School), danach bis 1964 die Französische Schule (Lycée Français). Im Herbst 1964 trat ich in die Deutsche Oberschule "Colegio San Miguel" ein, wo ich im Juni 1967 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 67/68 begann ich das Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Frühjahr 1972 legte ich dort die Prüfungen für das Hauptdiplom in Biologie ab und fertigte dann im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. G. von Jagow die Diplomarbeit an.

Seit Juli 1973 arbeite ich in der Stellung einer wissenschaftlichen Hilfskraft an der vorliegenden Dissertation.

